



На правах рукописи

Новиков Михаил Александрович

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОСОБЕННОСТЕЙ ТОКСИЧЕСКОГО
ДЕЙСТВИЯ СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩИХ НАНОБИОКОМПОЗИТОВ**

14.03.04 – токсикология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ангарск
2017 год

Диссертационная работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Восточно – Сибирский институт медико-экологических исследований» (ФГБНУ ВСИМЭИ)

Научный руководитель: **Рукавишников Виктор Степанович**
доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН

Научный консультант: **Соседова Лариса Михайловна**
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты: **Сычева Людмила Петровна**
доктор биологических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России)
Филатов Борис Николаевич
доктор медицинских наук, профессор,
директор Федерального государственного унитарного предприятия «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России)

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора)

Защита состоится «17» мая 2017 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 208.030.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» <http://www.toxicology.ru/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор



**Луковникова
Любовь Владимировна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Мировой научно-технический задел в области наноиндустрии направлен на создание новых высокоэффективных диагностических и терапевтических уникальных наноразмерных средств, за счёт биоспецифических свойств «привязанных» к наночастицам полимеров, предназначенных для обеспечения специфической доставки и связывания наночастиц с биомолекулами. Реализация их размерных физико-химических и биологических эффектов позволит поднять на новый качественный уровень степень разрешения большинства диагностических и терапевтических задач [Hoet P. H. M., Brüske-Hohlfeld I., Salata O. V., 2004; Yang X. et al., 2010; Ai J. et al., 2011].

Композитные материалы, содержащие наночастицы серебра, обладают уникальными свойствами и являются перспективными для медицины. Наносеребро, сохраняя присущие серебру в макроформе качества универсального асептического средства, способно оказывать специфическое действие при минимальных дозах, что позволяет удешевить препараты на основе серебра и сделать их доступными для лечения многих инфекционных заболеваний [Powers K. W. et al., 2007; Lansdown A. V. G., 2010; Stensberg C. et al., 2011; Singh S. K. et al., 2012].

Существенное значение при формировании серебросодержащих нанокомпозитов имеет наностабилизирующая эффективность матрицы, а также её природа. В Иркутском институте химии им. А. Е. Фаворского СО РАН были синтезированы нанобиокомпозиты на природной – арабиногалактан (АГ) [Нанокомпозит серебра на основе сульфатированного..., 2012] и синтетической – поли-1-винил-1,2,4-триазол (ПВТ) – матрицах [Поздняков А. С., 2011]. Синтезированные нанобиокомпозиты обладают такими благоприятными функциями, как доступность введения в макромолекулы различных функциональных групп в необходимом количестве, а также растворимость, биосовместимость, высокая координирующая способность [Прозорова Г. Ф. и др., 2010; Джигоев Ю. П. и др., 2012; Shurygina I. A. et al., 2011].

Применение данных нанокомпозитов невозможно без предварительного исследования их безопасности. Вместе с тем недостаточное количество научно обоснованных критериев оценки особенностей действия веществ в нанофазе, трудности их гигиенического регламентирования диктуют необходимость изучения механизмов и общих закономерностей их воздействия на организм на клеточном и субклеточном уровнях. Перспективность широкого внедрения нанобиокомпозитов, содержащих наносеребро [Stebounova L. V. et al., 2011], требует своевременного углублённого изучения их биологических эффектов, в том числе и отдалённых, обуславливающих возможный риск здоровью людей, имеющих с ними непосредственный контакт.

Степень научной разработанности темы

К данному моменту в России запатентованы способы синтеза металлсодержащих нанокомпозитов на полимерных матрицах природного и синтетического происхождения, получены первичные данные о цитотоксических и иммуномодулирующих свойствах данных нанокомпозитов, а также исследована их антимикробная активность [Прозорова Г. Ф. и др., 2010; Shurygina I. A. et al., 2011]. В настоящее время разработан ряд нормативно-методических документов, посвящённых вопросам оценки воздействия наночастиц и наноматериалов на организм человека и состояние окружающей среды [Медико-биологическая оценка безопасности..., 2010; Контроль наноматериалов в объектах..., 2011]. Существующие подходы к изучению особенностей действия наноматериалов основаны на методических разработках классической токсикологии, результаты которых не всегда обеспечивают безопасность для организма [Хотимченко С. А., Гмошинский И. В., Зайцева Н. В. и др., 2013]. В то же время отечественные учёные не достигли единого мнения в вопросах оценки безопасности

наноструктурированных материалов и препаратов; в вопросах определения допустимых пределов их воздействия, обеспечивающих защищённость жизненно важных функций организма; в принципах и критериях научно обоснованной системы медико-гигиенического мониторинга, совершенствование которой является одним из важных и перспективных направлений [Каркищенко Н. Н., 2009; Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности..., 2009; Хотимченко С. А., Гмошинский И. В., Тутельян А. В., 2009]. Существует потребность в разработке новых подходов к изучению особенностей воздействия наноматериалов на основании результатов электронно-микроскопических исследований клеток-мишеней, с анализом внутриклеточной протеомики и наблюдением в течение длительного периода [Глушкова А. В., Дулов С. А., Радилов А. С., Глушкова А. В., 2010; Потапов А. И. и др., 2013].

Таким образом, вышеизложенное, а также недостаточная информация о воздействии на организм инновационных полимерных нанобиокомпозитов медицинского назначения свидетельствует об актуальности данной проблемы.

Цель исследования

Дать сравнительную оценку в экспериментах на крысах биологическим эффектам полимерных нанобиокомпозитов, содержащих наносеребро в природной (арабиногалактан) и синтетической (поли-1-винил-1,2,4-триазол) матрицах.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Выявить проявления интоксикации и определить класс опасности при однократном внутрижелудочном введении животным синтетического и природного нанобиокомпозитов, а также некоторые биохимические показатели при подостром внутрижелудочном введении.

2. Оценить способность проникновения наночастиц серебра, инкапсулированных в природную и синтетическую матрицу, через гематоэнцефалический барьер и их распределение по некоторым внутренним органам.

3. Установить особенности морфологической структуры головного мозга у крыс в раннем и отдалённом периодах воздействия синтетического и природного нанобиокомпозитов.

4. Провести сравнительное изучение экспрессии белков апоптоза в клетках головного мозга крыс в раннем и отдалённом периодах воздействия синтетического и природного нанобиокомпозитов

5. Разработать алгоритм экспериментального изучения нейротоксических свойств нанобиокомпозитов, обеспечивающий возможность оценки нарушений морфологической структуры головного мозга у крыс, выраженности экспрессии белков-модуляторов апоптоза в нейронах.

Научная новизна

Получены новые данные о механизме действия наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерные матрицы, на ткань головного мозга экспериментальных животных.

При сравнительной оценке нейротоксичности полимерных нанобиокомпозитов, содержащих наносеребро в природной (арабиногалактан (нАГ)) и синтетической (поли-1-винил-1,2,4-триазол (нПВТ)) матрицах, установлено, что нарушения клеточной и субклеточной организации нейронов возникают при введении только нанобиокомпозита на природной матрице арабиногалактан.

Впервые получены данные о способности наночастиц серебра, инкапсулированных в природную матрицу, проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и, накапливаясь в нервной ткани, вызывать нарушения её структуры, характеризующиеся длительно сохраняющимися дистрофическими изменениями нейронов коры головного мозга.

Впервые показано, что нАГ вызывает активацию процесса апоптоза в нейронах, нарастающего с течением времени и сопровождающегося увеличением экспрессии белков bcl-2 и caspase-3.

Обоснован алгоритм экспериментальной оценки нейротоксических свойств нанобиокомпозитов, позволяющий выявить выраженность процесса апоптоза в ткани головного мозга крыс, на основании результатов иммуногистохимического метода определения экспрессии белков-модуляторов апоптоза bcl-2 и caspase-3 в нейронах головного мозга.

Теоретическая и практическая значимость результатов

Материалы диссертационной работы дают возможность дальнейшего развития теоретических основ профилактической токсикологии в части обоснования перспективного направления научных исследований, решающего проблемы оценки воздействия наноструктурированных веществ и препаратов на организм человека, в том числе и в отдалённом периоде воздействия. Полученные данные расширяют представления о нейротоксичности наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерные матрицы, вызывающих в ткани головного мозга крыс активацию апоптотического процесса.

Практическая значимость подтверждена экспериментальным доказательством формирования и прогрессирования морфофункциональных изменений в ткани головного мозга крыс в подостром и отдалённом периодах воздействия нАГ. Выявленные морфологические нарушения и активация апоптотического процесса в нейронах следует рассматривать как возможный патогенетический фактор, играющий определённую роль в формировании патологии нервной системы, в том числе и в отдалённом периоде. Полученные данные послужат базой для оценки или биологического скрининга медицинских нанобиокомпозитов, обеспечивающих внедрение в производство безопасных для организма человека наноструктурированных препаратов.

Методология и методы исследования

Методология исследования состояла в экспериментальной оценке токсического действия нанобиокомпозитов серебра на лабораторных животных, в раннем и отдалённом периодах воздействия. Основные методы исследования включали в себя выявление апоптотической активности нейронов, морфофункциональных изменений нейронов и нервной ткани коры головного мозга в целом путём проведения гистохимического, морфологического и электронно-микроскопического исследований, а также определение биохимических показателей организма белых крыс после воздействия нанобиокомпозитов серебра и параметров острой токсичности (среднесмертельная доза, LD₅₀).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Нанобиокомпозит, содержащий наночастицы серебра в природной полимерной матрице арабиногалактан, относится к IV малоопасному классу веществ, имеющих LD₅₀ при внутрижелудочном введении более 5000 мг/кг массы животного, вместе с тем последствием его воздействия являются нарушения клеточной и субклеточной организации нервной ткани головного мозга белых крыс.

2. Наночастицы серебра, инкапсулированные в природную биополимерную матрицу арабиногалактан, способны проникать через гематоэнцефалический барьер и, длительно сохраняясь в нервной ткани головного мозга крыс, вызывать нарушения её структуры.

3. Нейротоксическим следствием воздействия нанобиокомпозита, содержащего наночастицы серебра в природной полимерной матрице арабиногалактан, является активация процесса апоптоза в нейронах коры головного мозга белых крыс, нарастающего с течением времени.

Степень достоверности и апробация материалов исследования

Степень достоверности результатов определяется достаточным числом экспериментальных животных в группах, рандомизацией и формированием групп сравнения и контроля, адекватными токсикологическими, гистологическими, иммуногистохимическими и электронно-микроскопическими методами исследования, длительными сроками наблюдения и корректными методами статистической обработки данных.

Реализация результатов работы

Материалы исследования реализованы в учебном процессе кафедры общей гигиены ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России и используются в педагогической и научной деятельности учебно-образовательного центра ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований». Разработанные иммуногистохимические критерии токсического поражения головного мозга белых крыс при воздействии нанобиокомпозита на природной матрице АГ явились основой поданной заявки на патент «Способ оценки токсического действия наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу арабиногалактана, на ткань головного мозга лабораторных животных в отдалённом периоде воздействия» (патент № 2578545 от 27.03.2016).

Апробация результатов

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 2012), Всероссийской конференции «Актуальные проблемы лечения и реабилитации больных с профессиональными заболеваниями в условиях Сибири» (Ангарск, 2012), II международной школе-конференции «Прикладные нанотехнологии и нанотоксикология» (Листвянка, 2013), VI Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых учёных-биологов «Симбиоз – Россия» (Иркутск, 2013), III ежегодной конференции специалистов по работе с лабораторными животными Rus-LASA (Новосибирск, 2013), IV съезде токсикологов России (Москва, 2013), Пленуме Научного совета № 45 по медико-экологическим проблемам здоровья работающих (Санкт-Петербург, 2014), Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных «Экология и здоровье населения» (Иркутск, 2015), IV Международной научно-практической конференции «Нanomaterials and Living Systems NLS-2016» (Москва, 2016), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоретические основы, идентификация опасности для здоровья и пути её снижения» (Екатеринбург, 2016).

Личный вклад автора

Автором проведён сбор и анализ научной литературы по вопросам нанотоксикологии металлов, сформулированы цель и задачи исследования, определены объекты и объём работы, проведены поиск и освоение методов исследований и их обоснование для решения поставленных задач. Осуществлён основной эксперимент по воздействию нанобиокомпозитов на организм экспериментальных животных (белых крыс), выполнено формирование базы данных и обработка полученных результатов, проведено их обобщение и обсуждение. Также автор самостоятельно произвёл оформление диссертации, подготовил публикации по теме диссертации. Доля участия автора в получении и накоплении результатов составляет 80–85 %, в статистической обработке и анализе материалов – 90 %.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 24 научных работы, из них 17 – в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации материалов диссертационных работ.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 135 страницах, состоит из введения, обзора литературы, четырёх глав собственных исследований и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 21 таблицей, 58 рисунками. Список литературы включает 207 источников, из которых 137 – иностранные.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 содержит обзор литературы о современных представлениях воздействия наночастиц серебра на живой организм. **Глава 2** включает описание объектов, материалов и методов исследования. **Главы 3 и 4** объединяют результаты исследования нарушений в организме белых крыс при внутрижелудочном введении наночастиц серебра на матрице АГ и ПВТ. **Глава 5** включает в себя сравнительную оценку нарушений, выявленных при действии на живой организм нанобиокомпозитов. **Глава 6** посвящена разработке алгоритма экспериментальных исследований нейротоксических свойств нанобиокомпозитов. В заключении представляется обсуждение результатов исследования. Далее приведены выводы и список литературных источников.

ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве исследуемых субстанций были выбраны нанобиокомпозиты, содержащие наносеребро, инкапсулированное в стабилизирующие матрицы: природный полимер АГ и синтетический - ПВТ, синтезированные в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН.

Природный наностабилизирующий полисахарид АГ представляет собой водорастворимый белый или кремовый порошок, без вкуса и запаха, состоящий из двух моносахаридов: галактозы и арабинозы. Синтезированный на его основе нанобиокомпозит нАГ, по результатам исследований физико-химических параметров, содержит наночастицы серебра в нульвалентном состоянии, сферической формы с преобладающим размером 4-8 нм. Содержание серебра в образце составляет 3,1%.

Синтетический полимер ПВТ представляет собой субстанцию, способную стабилизировать наночастицы серебра в нульвалентном состоянии. Синтезированный на его основе нанобиокомпозит нПВТ содержит в своём составе наночастицы серебра, которые имеют сферическую форму с преимущественным размером 2-6 нм. Содержание серебра в образце составляет 7,03%.

Для решения поставленных задач были проведены комплексные поэтапные исследования, включающие в себя токсикологические, гистологические, электронно-микроскопические, иммуногистохимические методы и методы количественной и статистической оценки полученного материала (Рисунок 1).



Рисунок 1 - Дизайн исследования.

Токсикологические исследования включали определение токсических свойств НАГ и нПВТ при остром и подостром воздействии в различных дозах. Исследования проведены на 120 половозрелых белых беспородных крыс-самцов массой от 180-260 грамм и 72 беспородных белых мышах массой от 18 до 25 г., полученных путём собственного воспроизводства в виварии ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований». Все экспериментальные животные содержались на стандартном рационе. Животные, используемые в экспериментах, имели заключение Областной ветеринарной лаборатории (г. Иркутск) на бактерионосительство, отсутствие общих заболеваний и паразитических инвазий, однородность по массе тела и возрасту. Работа выполнена в соответствии с требованиями «Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ВОЗ, Женева, 1985) и «Правилами лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. №708н).

Группы животных были сформированы в соответствии с методическими рекомендациями "Оценка безопасности наноматериалов" (приказ № 280 от 12 октября 2007 г., Москва, Россия), согласно которым, кроме экспонирования препаратами, содержащими наноматериалы, также исследуются препараты, содержащие серебро в макроформе. Исследованные нанобиокомпозиты суспендировали в дистиллированной воде и вводили животных в течение 9 дней натошак внутривентрикулярно с помощью атравматичного металлического зонда, дозируя путём изменения вводимого объема, не превышающего для крыс и мышей 0,5 мл. Кормление животных осуществлялось через 3 часа после введения веществ.

Было сформировано 8 групп животных. Особи, сформировавшие I группу, являлись контрольными, им вводили по 0,5 мл дистиллированной воды. Животные II группы получали водную дисперсию коллоидного серебра (КС), стабилизированного казеином, с содержанием серебра 8%. Животным III группы вводили «чистый» АГ, без добавления наночастиц серебра в дозе, эквивалентной введению нанокompозита. Животным IV группы вводили водный раствор наночастиц серебра, инкапсулированных в природную

биополимерную матрицу – арабиногалактан, из расчёта 100 мкг серебра на килограмм массы в 0,5 мл дистиллированной воды (нАГ100). Животным V группы вводили аналогичный водный раствор из расчёта 500 мкг серебра на килограмм массы в 0,5 мл дистиллированной воды (нАГ500). Животные VI группы получали в эквивалентных количествах раствор ПВТ (без наночастиц серебра). Животным VII группы вводили водный раствор наночастиц серебра, инкапсулированных в синтетическую биополимерную матрицу – поли - 1 - винил - 1,2,4 – триазол, из расчёта 100 мкг серебра на килограмм массы в 0,5 мл дистиллированной воды (нПВТ100). Животные VIII группы получали аналогичный водный раствор из расчёта 500 мкг серебра на килограмм массы в 0,5 мл дистиллированной воды (нПВТ500).

Обследование белых крыс проводили в 2 этапа: непосредственно после окончания воздействия (ранний период) и через 6 месяцев после окончания воздействия (отдаленный период). На следующий день после окончания воздействия определяли массу тела животных, а также массы внутренних органов: печени, почек, селезёнки. В крови проводили определение активности каталазы и пероксидазы, а также содержание ТБК – активных продуктов: малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК), в печени и крови - уровня восстановленного глутатиона.

Для выполнения **патоморфологических** исследований после декапитации головной мозг от каждого исследуемого животного был извлечен и фиксирован в нейтральном буферном растворе формалина (10%), обезвожен этанолом восходящей концентрации (70, 80, 90, 95 и 100%) и помещен в гомогенизированную парафиновую среду для гистологических исследований HistoMix (BioVitrum, Россия). Подготовку нервной ткани для просвечивающей электронной микроскопии осуществляли по методу А.А.Миронова (1994). Далее приготовленные с помощью микротомы МС-1 серийные фронтальные срезы толщиной 4-5 мкм на уровне Bregma - 6,10 мм, Interaural - 3,90 мм, окрашивали на обычных гистологических предметных стёклах гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии и крезилловым фиолетовым по методу Ниссля [Коржевский Д.Э., 2005]. Была изучена нервная ткань височно-теменной зоны сенсомоторной коры головного мозга, как нервный центр, обеспечивающий регуляцию основных физиологических функций организма и сложные формы поведения. Исследование полученных срезов осуществляли при помощи светооптического исследовательского микроскопа Olympus BX 51 (Япония) с вводом микроизображений в компьютер при помощи камеры Olympus E420. Морфологические исследования ткани головного мозга выполнены совместно с к.б.н. Е.А.Титовым.

Для исследования биологического ответа организма на субклеточном уровне применяли **иммуногистохимический** метод определения активности белков – модуляторов апоптоза bcl-2 и caspase-3 в нейронах головного мозга белых крыс. Полученные на микротоме срезы были помещены на полизиновые стёкла (Menzel, Германия) и окрашены с помощью моноклональных антител (Lab Vision Corporation, США) и вторичных антител, конъюгированных с полимером и пероксидазой (Lab Vision Corporation, США). Визуализацию прореагировавших первичных антител проводили при помощи хромогена DAB⁺ (Lab Vision Corporation, США). Окрашенные срезы фиксировали полистиролом и накрывали покровным стеклом. После высыхания полистирола полученные микропрепараты просматривали на светооптическом исследовательском микроскопе. Далее при помощи системы микроскопии и анализа Image Score M были проанализированы заранее выбранные параметра анализа полученных фотоматериалов: общее количество нейронов на единицу площади, среди них - количество тёмных клеток, а также - иммунопозитивных и иммунонегативных нормальных нейронов. Иммунопозитивными являлись окрашенные на антитела к белку caspase-3 и bcl-2 клетки, а иммунонегативными- неокрашенные клетки, характеризующие, соответственно, нейроны с экспрессией и без экспрессии изучаемых белков. Тёмными считали уменьшенные в объеме, как правило, палочковидной формы, резко окрашенные

клетки без четко выделенного ядра [Гайкова О.Н., 2015]. Количество клеток определяли на единицу площади гистологического препарата ($0,2 \text{ мм}^2$).

Электронную микроскопию использовали для ультраструктурной оценки состояния нейронов коры головного мозга. Исследования выполняли в Центре коллективного пользования «Электронная микроскопия» на базе ФГБУН Лимнологический институт СО РАН (зав. центром - д.б.н., профессор Е.В.Лихошвай) на электронном микроскопе Leo 906E (Zeiss, Германия). Морфометрический анализ ткани головного мозга включал в себя обзорную оценку состояния ткани мозга, вычисление площади митохондрий в разные периоды обследования. Обработку полученных изображений осуществляли с помощью пакета прикладных программ Image Scope M. Определение наночастиц серебра в тканях головного мозга выполняли при помощи просвечивающего микроскопа Technai 2G (FEI, США) с полевым эмиттером и энергодисперсным детектором для элементного анализа в центре коллективного пользования приборами «Байкальский центр нанотехнологий» ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет» (зав. центром – д. ф. – м.н. А.Д. Афанасьев), в гомогенатах внутренних органов - при помощи атомно-абсорбционного спектрометра с плазменной и электротермической атомизацией AAnalyst 200 (Perkin-Elmer, США) на базе химико-аналитической производственной лаборатории ФГБУН Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН (зав. лабораторией – к. ф. – м.н В.И. Меньшиков). Всего было выполнено 480 исследований по вышеописанным методикам.

На белых мышах обоего пола выполняли исследования по определению **значений среднесмертельных доз (DL50)** исследуемых нанобиокомпозитов, которые вводили однократно внутрижелудочно атравматичным зондом в диапазоне от 1500 до 5000 мг/кг, разведенных в 0,5 мл физиологического раствора [Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Москва, 2005].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.1 for Windows (лиц. № AXXR004E642326FA). Проверку значимости различий выборок изучаемых показателей животных выполняли при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни, так как сравниваемые выборки не удовлетворяли условиям нормальности распределения, определение нормальности проводили с помощью W – критерия Шапиро – Уилка. Нулевые гипотезы об отсутствии различий между группами отвергали при достигнутом уровне значимости соответствующего статистического критерия $p \leq 0,01$.

Работа выполнена по основному плану НИР ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» «Изучение механизмов формирования и прогрессирования нейродегенеративных и бронхо-лёгочных нарушений при воздействии промышленных токсикантов» (номер государственной регистрации №01200803591), в соответствии с Приоритетными направлениями развития науки, технологий и техники в РФ «Индустрия наносистем» и критической технологии РФ «Биомедицинские и ветеринарные технологии». Институт соответствует установленным требованиям по разработке санитарно-гигиенических и эпидемиологических нормативных документов и имеет аттестат аккредитации испытательной лаборатории № ГСЭН.RU.ЦОА.149, зарегистрированный в Государственном реестре №РОСС.RU.0001.510164 от 26.10.2011г.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с поставленными задачами исследования было проведено изучение токсикометрических параметров острой токсичности нанобиокомпозитов, содержащих наносеребро, инкапсулированное в природную и синтетическую полимерную матрицу. Наиболее точной количественной характеристикой токсичности вещества

обладает среднесмертельной дозой (LD50). При внутрижелудочном введении изучаемых препаратов в дозах 1500 мг/кг, 3000 мг/кг, 5000 мг/кг массы гибели животных на протяжении 14 дней не отмечено. Поведение, внешний вид, масса животных, потребление корма и воды, не отличалось от таковых у контрольных животных. Таким образом, оба изучаемых нанобиокомпозиата, содержащие наносеребро, инкапсулированное как в природную, так и в синтетическую полимерную матрицу, отнесены по параметрам токсикометрии к 4 малоопасному классу веществ, имеющим DL50 при внутрижелудочном введении более 5000 мг/кг массы животного. По результатам исследования биохимических показателей при подостром введении нАГ100 наблюдалась активация защитных звеньев антиоксидантной системы (повышение содержания SH-глутатиона, активности каталазы), при этом уровень конечных продуктов перекисного окисления липидов оставался неизменным. Подострое воздействие нПВТ100 не вызывало достоверных изменений изучаемых биохимических показателей.

Оценка нарушений морфологической структуры нервной ткани головного мозга крыс при воздействии нанобиокомпозиатов, содержащих наносеребро, конъюгированное на природной и синтетической полимерной матрице, обусловлена небольшим количеством информации о нейротоксичности наночастиц серебра, представленной в научной печати [Hadrup N. et al., 2013]. Сравнительный анализ результатов модельных экспериментов на животных выявил различный характер нейротоксических эффектов изучаемых инновационных полимерных нанобиокомпозиатов.

Результаты морфологического исследования нервной ткани животных, получивших нАГ, свидетельствовали о существенных изменениях в структуре нервной ткани. Так, при введении нАГ100 как в раннем, так и в отдалённом периоде обследования, наблюдалось наличие тёмных нейронов (Рисунок 1А), расширение периваскулярных пространств (Рисунок 1Б), очаговое разрыхление проводящих пучков (Рисунок 1В), нейронофагия (Рисунок 1Г).

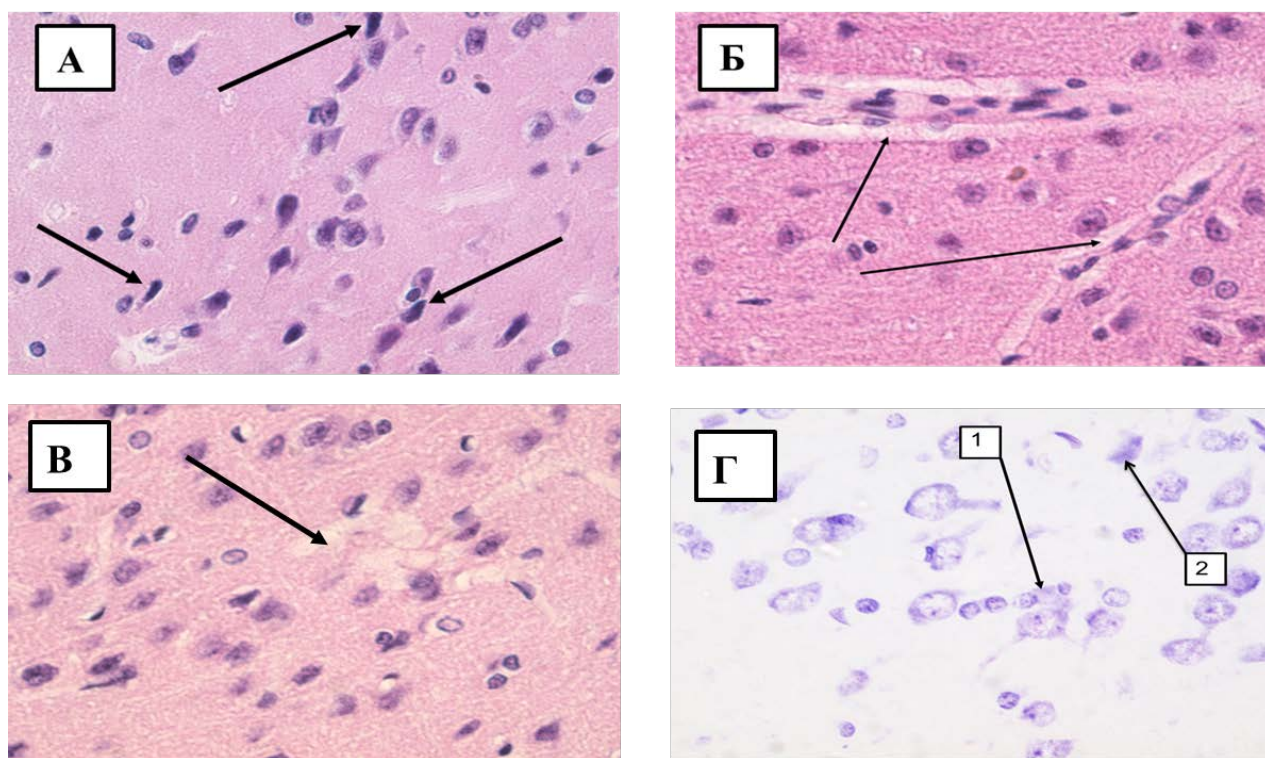


Рисунок 1 - Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ 100 в раннем периоде обследования (А,Б), отдалённом периоде обследования (В,Г). А) Тёмные нейроны (↑); Б) Расширение периваскулярных пространств (↑); В) Очаговое разрыхление проводящих пучков (↑); Г) 1 – нейронофагия, 2

– тёмный нейрон. Окр. Гематоксилин-эозин. Ув. X 400 (А,Б,В), окр. Крезилловым фиолетовым по Нисслию. Ув. X 400 (Г).

При воздействии нАГ500 к увеличению периваскулярных пространств, нейронофагии присоединялись набухание миоцитов и эндотелиоцитов сосудов, утолщение стенки артерий, нарастание количества тёмных нейронов (Рисунок 2). Указанные нарушения нарастали ко второму сроку обследования. Аналогичные изменения в нервной ткани описаны в исследованиях [Abdelhalim M.A.K, Jarrar B.M., 2012] при введении крысам наночастиц золота в сопоставимых дозах.

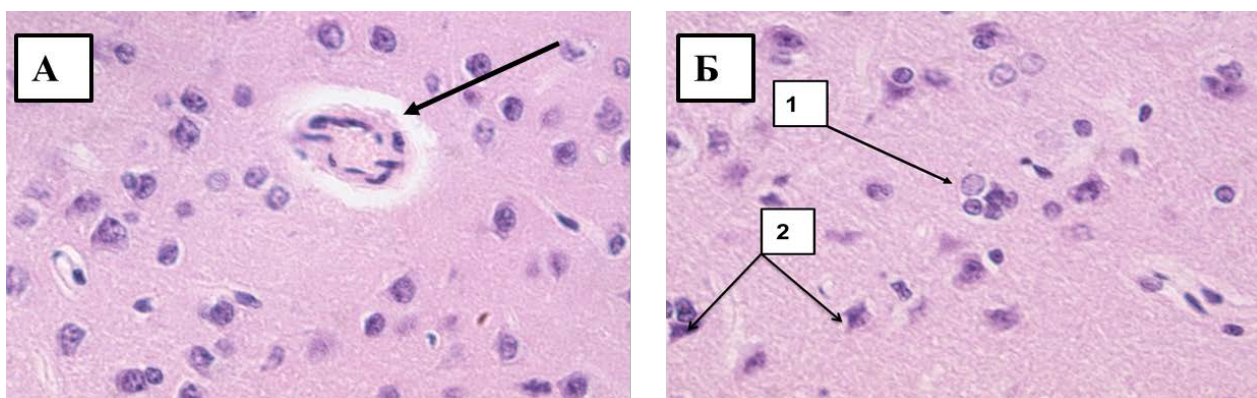


Рисунок 2 - Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ500 (ранний срок обследования). А) Расширение периваскулярных пространств, стенка артерии утолщена, рыхлая, миоциты и эндотелиоциты набухшие (стрелка); Б) 1 – нейронофагия, 2 – тёмные нейроны. Окр. Гематоксилин-эозин. Ув. X 400.

При оценке морфологической структуры нервной ткани животных группы АГ во всех сроках обследования выявлены аналогичные группе нАГ100 изменения, однако выраженность их была менее значительной.

При ультраструктурном обследовании площади в раннем и отдалённом периоде наблюдения установлено достоверное увеличение митохондрий нейронов в группах нАГ100 и нАГ500 (Таблица 1).

Таблица 1 - Результаты измерения площади митохондрий (μm^2) в нейронах животных групп контроля, АГ, нАГ100 и нАГ500 в раннем и отдалённом периодах обследования, Med ($Q_{25} - Q_{75}$)

Группы	Ранний период обследования	Отдаленный период обследования
Контроль	0,75 (0,52-1,00)	0,76 (0,59-1,02)
КС	0,77 (0,61-0,98)	0,79 (0,69-0,89)
АГ	0,69 (0,08-4,23)	0,76 (0,12-4,19)
нАГ100	1,57 (0,28-4,40) *;#	1,85 (0,12-4,50) *
нАГ500	1,51 (0,38-3,60) *;#	2,16 (0,65-4,50) *;#

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0,01$ * – по сравнению с группой контроля, # – по сравнению с группой АГ

В сравнении с выявленными изменениями структуры нервной ткани при воздействии нАГ, морфологическое исследование препаратов животных, получивших нПВТ, показало лишь незначительное расширение проводящих волокон в нервной ткани теменно-височной доли головного мозга животных в раннем сроке обследования.. Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных

группы, получившей «чистый» синтетический полимер ПВТ, показали лишь единичные изменения, состояние нервной ткани в данном случае, как и при введении животным КС, было сопоставимо с результатами, полученными в контрольной группе животных.

У животных, экспонированных нАГ, в ткани головного мозга в оба срока обследования по результатам исследования элементного состава были обнаружены наночастицы серебра, что свидетельствовало о способности природного полимера-арабиногалактан доставлять наносеребро в головной мозг, проникая через ГЭБ (Рисунок 4).

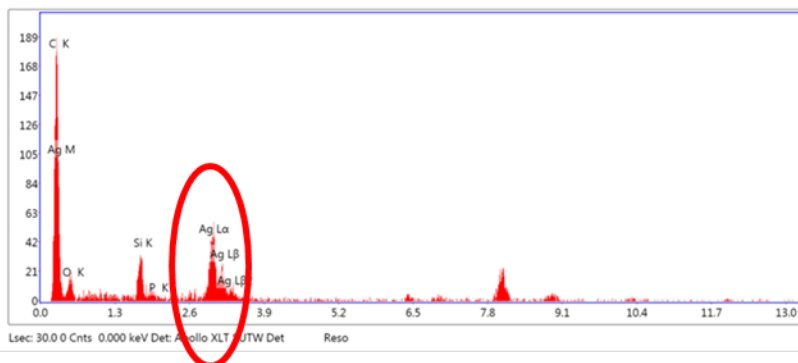


Рисунок 4 - Результаты спектрометрии участка ткани головного мозга животного, подверженного воздействию нАГ100 (отдалённый период обследования).

Исследование показателей экспрессии регуляторных белков апоптоза при воздействии инновационных нанобиокомпозитов выявило, что их изменения имеют свои особенности в зависимости от вводимого препарата, его дозы и времени обследования.

Изучение экспрессии апоптоз-ингибирующего белкового фактора bcl-2 показало, что при введении «чистого» АГ в раннем сроке обследования наблюдалось достоверное по сравнению с контролем и КС изменение процентного содержания всех типов исследуемых клеток по отношению к их общему количеству на площади в 0.2 мм^2 , в то время как при введении КС такие изменения не выявлялись. Однако, при введении обеих доз нАГ ситуация кардинально изменялась – в ранний период обследования в группе нАГ500 происходило статистически значимое, как по сравнению с КС, контролем, так и с АГ, увеличение процентного содержания тёмных нейронов (Таблица 2). Одновременно с этим наблюдалось достоверное увеличение количества нормальных иммунопозитивных клеток и, соответственно, снижение нормальных иммунонегативных клеток. В группе нАГ100 все изменения в ранний период обследования были статистически значимы лишь к группе контроля и КС. Полученные результаты указывают на активацию экспрессии апоптоз-ингибирующего белкового фактора и мобилизацию защитных механизмов, препятствующих развитию апоптоза.

При обследовании через 6 месяцев (отдаленный срок) выявленная направленность изменений сохранялась, при этом значительно чаще по сравнению с контрольной группой и группой АГ выявлялись тёмные и нормальные иммунопозитивные к bcl-2 клетки с одновременным сокращением количества нормальных клеток без экспрессии к изучаемому белку. Следует отметить, что данный процесс был более выражен при воздействии наночастиц серебра в дозе 500 мкг/кг.

Таблица 2 - Экспрессия bcl-2 при воздействии АГ, нАГ100 и нАГС500 в раннем и отдаленном периоде обследования, % от общего количества клеток в 0.2 мм² (Med (Q₂₅ – Q₇₅); n=10)

Группы	Тёмные клетки	Нормальные иммунопозитивные клетки	Нормальные иммунонегативные клетки
Контроль	<u>2,01 (1,86-2,19)</u> 3,14 (2,07-4,91)	<u>2,07 (1,55-2,19)</u> 1,42 (1,12-1,95)	<u>95,92 (94,99-97,33)</u> 95,44 (93,26-95,61)
КС	<u>1,59 (1,45-1,79)</u> 2,76 (2,18-3,50)	<u>1,52 (1,22-1,84)</u> 1,38 (1,16-2,21)	<u>96,89 (96,43-97,06)</u> 95,86 (94,69-96,14)
АГ	<u>3,33 (3,00-4,07)^{*,#}</u> 3,65 (2,22-5,12)	<u>3,89 (2,46-5,93)^{*,#}</u> 2,88 (2,21-3,36)	<u>93,08 (90,23-93,99)^{*,#}</u> 93,47 (89,74-94,96)
нАГ100	<u>4,41 (4,13-5,03)^{*,#}</u> 6,20 (4,32-7,45) [#]	<u>5,04 (4,31-5,35)^{*,#}</u> 8,05 (6,83-8,89) ^{*,#;♦}	<u>90,55 (89,94-91,41)^{*,#}</u> 85,75 (84,11-88,55) ^{*,#;♦}
нАГ500	<u>4,81 (3,83-5,45)^{*,#;♦}</u> 13,18 (11,67-16,67) ^{*,#;♦;§}	<u>6,20 (4,91-6,57)^{*,#;♦}</u> 7,27 (5,49-7,50) ^{*,#;♦}	<u>88,99 (85,45-97,89)[♦]</u> 79,55 (77,44-81,98) ^{*,#;♦;§}

Примечание: в числителе – ранний период обследования, в знаменателе – отдаленный период обследования; * - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при p<0,01; # - различия статистически значимы по сравнению с группой КС при p<0,01; ♦ - различия статистически значимы по сравнению с группой АГ при p<0,01; § - различия статистически значимы по сравнению с группой нАГ100 при p<0,01. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна-Уитни.

При исследовании экспрессии эффекторного белка caspase-3, активирующего процесс апоптоза, при воздействии как нАГ100, так и нАГ500 в оба периода обследования выявлено достоверное по отношению к группе АГ изменение содержания практически всех типов исследуемых клеток, за исключением нормальных иммунопозитивных в группе нАГ100 в раннем сроке обследования (Таблица 3). Наблюдалось сокращение на единицу площади количества нормальных неизмененных клеток без экспрессии проапоптотического белка caspase-3. В то время как тёмных клеток и нормальных клеток, экспрессирующих caspase-3 значительно возросло, особенно при воздействии повышенной дозы наночастиц. Выявленные результаты свидетельствуют об активации апоптотических процессов уже на 10-й день после окончания воздействия нанобиокомпозиата. Это сочетается с данными экспрессии ингибитора апоптоза bcl-2, который в ответ на активацию апоптотического процесса при воздействии нАГ начинает в эти же сроки оказывать протективное действие. В отдаленном периоде обследования количество тёмных и нормальных клеток, экспрессирующих белок caspase-3, становится еще выше, что свидетельствует о нарастании с течением времени процесса апоптоза при воздействии нанобиокомпозиата на природной матрице-арабиногалактан.

Таблица 3 - Экспрессия белка caspase-3 при воздействии АГ, нАГ100 и нАГС500 в раннем и отдаленном периоде обследования, % от общего количества клеток в 0.2 мм² (Med (Q₂₅ – Q₇₅); n=10)

Группы	Тёмные клетки	Нормальные иммунопозитивные клетки	Нормальные иммунонегативные клетки
Контроль	<u>2,56 (1,79-2,74)</u> 2,60 (2,17-3,52)	<u>1,93 (1,77-2,09)</u> 1,45 (0,89-1,74)	<u>95,51 (94,61-95,67)</u> 95,95 (94,93-96,75)
КС	<u>1,91 (1,62-2,49)</u> 2,29 (1,75-2,64)	<u>1,67 (1,14-2,49)</u> 2,25 (1,74-2,67)	<u>96,42 (95,15-96,76)</u> 95,46 (95,04-96,53)

АГ	<u>2,16 (1,91-2,99)</u> 1,69 (0,33-2,21)	<u>1,92 (1,66-2,11)</u> 0,10 (0,00-2,03)	<u>95,92 (95,21-96,51)</u> <u>98,31 (94,83-98,73)</u>
нАГ100	<u>3,89 (3,65-5,22)</u> *;#;♦ 7,05 (6,25-11,45) *;#;♦	<u>4,90 (2,34-12,78)</u> 8,89 (6,26-31,24) *;#;♦	<u>91,21 (80,85-92,06)</u> *;#;♦ 84,06 (59,71-86,35) *;#;♦
нАГ500	<u>6,58 (5,88-8,55)</u> *;#;♦ 13,20 (10,74-18,24) *;#;♦;§	<u>5,10 (3,18-8,24)</u> *;#;♦ 6,96 (5,71-9,52) *;#;♦	<u>88,32 (84,57-90,20)</u> *;#;♦ 79,84 (74,29-80,18) *;#;♦

Примечание: в числителе – ранний период обследования, в знаменателе – отдаленный период обследования; * - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при $p < 0,01$; # - различия статистически значимы по сравнению с группой КС при $p < 0,01$; ♦ - различия статистически значимы по сравнению с группой АГ при $p < 0,01$; § - различия статистически значимы по сравнению с группой нАГ100 при $p < 0,01$. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна-Уитни.

При сравнении экспрессии двух исследуемых регуляторных белков установлено, что в группе нАГ500 в раннем сроке обследования при оценке экспрессии белка caspase-3 число тёмных клеток в 1,37 раза больше, чем таковых при оценке экспрессии к белку bcl-2. Количество нормальных иммунопозитивных клеток с экспрессией bcl-2 в группах нАГ100 и нАГ500 возросло по сравнению с группой АГ незначительно, тогда как число тех же клеток с экспрессией к caspase-3 выше в 2,55 и 2,65 раза соответственно. В отдалённом сроке обследования в группе нАГ500 число тёмных и нормальных иммунопозитивных клеток с экспрессией caspase-3 также значительно выше аналогичных показателей экспрессии к белку bcl-2 (в 4,5 и 4,4 раза соответственно) что свидетельствует о продолжающемся активном апоптотическом процессе, подавляющем действие антиапоптотического белка.

Таким образом, увеличение количества нейронов с экспрессией проапоптотического белка, а также резкое снижение числа нормальных нейронов в отдаленном периоде обследования белых крыс свидетельствует о динамическом нарастании патологического процесса. Появление отдаленных эффектов действия при введении крысам нАГ и отсутствие подобных при воздействии «чистым» АГ может быть обусловлено физико-химическими свойствами наночастиц серебра: такими, как длительное персистирование в организме, способность к материальной кумуляции и к образованию конгломератов в структурах клетки и межклеточном пространстве [Loeschner K. et al., 2011]. При этом длительное нахождение и незначительная элиминация наночастиц серебра из организма вполне вероятно способствует формированию накопленных неблагоприятных эффектов [Asghari S. et al., 2012].

Сопоставление результатов морфологического исследования нервной ткани с данными экспрессии белков caspase-3 и bcl-2 позволяет сделать заключение о способности наносеребра, инкапсулированного в полимерную матрицу арабиногалактан, индуцировать в нейронах коры головного мозга запуск апоптотического каскада, который после 9-ти кратного введения нанобиокомпозита находится на начальной стадии дисрегуляции механизмов программированной клеточной смерти и постепенно с течением времени приводит к состоянию клетки с характерными признаками активного апоптотического процесса. Учитывая, что при введении нАГ возрастает число тёмных клеток, можно заключить, что гибель клеток идет как с запуском программы апоптоза, так и обусловлена другими механизмами клеточного повреждения и гибели. По нашему мнению при запуске программированной клеточной гибели вполне вероятен митохондриальный путь вступления клетки в апоптоз, когда образовавшиеся из прокаспаз активные каспазы подавляют деятельность антиапоптотического белка bcl-2. Caspase 3 является одним из конечных пунктов каскада активации протеолитических ферментов, приводящих к программированной смерти клетки [Chen H. H., 2011] Высокий уровень экспрессии белка bcl-2 в нейронах коры головного мозга имеет важное значение для

предотвращения данного процесса, но активности антиапоптотического белка не хватает для формирования внутриклеточных защитных механизмов.

Анализ нарушений структуры нервной ткани головного мозга крыс и изменений экспрессии регуляторных белков позволяет с неопровержимой достоверностью утверждать, что полимерная матрица на основе природного биополимера арабиногалактана обладает способностью проникать через ГЭБ, доставляя наночастицы серебра в нервную ткань головного мозга. Подтверждением этому с точки зрения доказательной медицины служит факт обнаружения наночастиц серебра в нервных клетках при исследовании элементного состава образцов тканей головного мозга методом просвечивающей электронной микроскопии. Вышеуказанные факты свидетельствуют том, что полимерная матрица на основе природного биополимера арабиногалактана является перспективным соединением в качестве контейнера для адресной доставки лекарственных и диагностических препаратов в нервную ткань головного мозга.

В целом все сказанное позволяет полагать, что наносеребро, инкапсулированное в полимерной матрице - арабиногалактан, преодолевает гематоэнцефалический барьер, проникая в ткань головного мозга. Способность молекул серебра блокировать тиоловые группы структурных белков и ферментных систем, участвующих в регуляции мембранной проницаемости [Оксегендлер Г., 1982], высвобождение из митохондрий цитохрома С и активация проапоптотического белка caspase 3 относятся к числу пусковых реакций биохимического механизма, приводящего к запрограммированной смерти клетки. В дальнейшем снижение количества нейронов на единицу площади может приводить к замещению их глиальными клетками с развитием глиоза и формированием нейродегенеративного процесса. Аналогичного мнения придерживаются исследователи из ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, изучавшие действие на организм белых крыс наночастиц меди, воздействие которых вызывало значительное усиление экспрессии caspase-3 в микроглиоцитах коры головного мозга уже через 7 суток после однократного внутримышечного введения в дозе 2 мг/кг массы животного [Сизова Е.А. и др., 2013].

Анализ результатов экспрессии апоптоз-регулирующих белков при введении белым крысам нПВТ не выявил по сравнению с введением чистой полимерной матрицы ПВТ, значимых изменений, свидетельствующих об активации апоптоза в нервных клетках на протяжении всего периода наблюдений. Регистрируемые изменения в количествах всех типов изучаемых клеток достоверно отличались лишь от таковых в препаратах контрольной группы, в то время как при воздействии на лабораторных животных «чистым» ПВТ без наночастиц серебра, нПВТ100 и нПВТ500 достоверной разницы изучаемых показателей между собой не выявлено (Таблица 4, Таблица 5).

Полученный результат дал нам основание сделать вывод об отсутствии разницы в эффектах воздействия на организм белых крыс нанобиокомпозита, содержащего наносеребро в синтетической матрице ПВТ, в дозировках 100 и 500 мкг/кг и «чистого» ПВТ. Таким образом, выявленные в данном случае изменения экспрессии регуляторных белков апоптоза обусловлены преимущественно матрицей - синтетическим полимером и могут рассматриваться как проявления стандартного ответа организма на введение чужеродного вещества. По нашему мнению, ПВТ и его производные, благодаря особенностям химического строения (отсутствию открытых химических связей, общей химической устойчивости) не распадается на отдельные компоненты и не встраивается в цепь биологических реакций в организме и выводится в практически неизменном виде. Предполагаем, что в силу замкнутой химической структуры наносеребро не выделяется из полимерной матрицы ПВТ, не проникает через гематоэнцефалический барьер и не принимает участия в реакциях клеточного метаболизма.

Таблица 4 - Экспрессия bcl-2 при воздействии ПВТ, нПВТ100 и нПВТ500 в раннем и отдаленном периоде обследования, % от общего количества клеток в 0.2 мм² (Med (Q25 – Q75); n=10)

Группы	Тёмные клетки	Нормальные иммунопозитивные клетки	Нормальные иммунонегативные клетки
Контроль	<u>2,01 (1,86-2,19)</u> 3,14 (2,07-4,91)	<u>2,07 (1,55-2,19)</u> 1,42 (1,12-1,95)	<u>95,92 (94,99-97,33)</u> 95,44 (93,26-95,61)
КС	<u>1,59 (1,45-1,79)</u> 2,76 (2,18-3,50)	<u>1,52 (1,22-1,84)</u> 1,38 (1,16-2,21)	<u>96,89 (96,43-97,06)</u> 95,86 (94,69-96,14)
ПВТ	<u>4,06 (3,13-5,03)*:#</u> 3,90 (3,10-7,39)	<u>4,19 (2,79-4,46)#</u> 4,46 (4,21-5,10)*:#	<u>91,75 (90,45-93,52)*:#</u> 91,64 (88,28-93,08)*:#
нПВТ100	<u>4,00 (3,75-4,57)*:#</u> 3,66 (2,55-5,03)#	<u>4,66 (3,89-5,36)*:#</u> 4,90 (3,79-6,50)*:#	<u>91,34 (90,34-91,85)*:#</u> 91,44 (87,58-93,43)*:#
нПВТ500	<u>3,92 (2,52-4,32)*:#</u> 3,20 (1,92-3,73)*:#	<u>3,58 (2,85-4,32)*:#</u> 4,63 (3,13-5,01)*:#	<u>92,50 (91,67-93,25)*:#</u> 92,17 (90,66-93,65)*:#

Примечание: в числителе – ранний период обследования, в знаменателе – отдаленный период обследования; * - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при p<0,01; # - различия статистически значимы по сравнению с группой КС при p<0,01. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна-Уитни.

Таблица 5 - Экспрессия caspase-3 при воздействии ПВТ, нПВТ100 и нПВТ500 в раннем и отдаленном периоде обследования, % от общего количества клеток в 0.2 мм² (Med (Q25 – Q75); n=10)

Группы	Тёмные клетки	Нормальные иммунопозитивные клетки	Нормальные иммунонегативные клетки
Контроль	<u>2,56 (1,79-2,74)</u> 2,60 (2,17-3,52)	<u>1,93 (1,77-2,09)</u> 1,45 (0,89-1,74)	<u>95,51 (94,61-95,67)</u> 95,95 (94,93-96,75)
КС	<u>1,91 (1,62-2,49)</u> 2,29 (1,75-2,64)	<u>1,67 (1,14-2,49)</u> 2,25 (1,74-2,67)	<u>96,42 (95,15-96,76)</u> 95,46 (93,56-96,53)
ПВТ	<u>3,97 (3,03-4,10)</u> 2,49 (1,90-6,14)*:#	<u>3,93 (3,42-4,36)*:#</u> 2,46 (2,02-4,36)*:#	<u>92,10 (90,00-93,90)*:#</u> 95,05 (93,56-98,97)*:#
нПВТ100	<u>3,89 (3,55-4,97)*:#</u> 2,30 (2,02-3,14)	<u>4,24 (2,61-15,00)</u> 2,41 (2,00-2,99)	<u>91,87 (83,85-93,06)*:#</u> 95,29 (93,48-95,88)
нПВТ500	<u>3,02 (2,32-4,41)</u> 2,79 (2,19-3,13)	<u>3,93 (3,29-4,52)#</u> 2,80 (2,35-3,30)*:#	<u>93,05 (91,46-94,59)#</u> 94,41 (93,20-95,36)*:#

Примечания: в числителе – ранний период обследования, в знаменателе – отдаленный период обследования; * - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при p<0,01; # - различия статистически значимы по сравнению с группой КС при p<0,01. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна-Уитни.

В целом, сравнительная оценка результатов проведенного экспериментального моделирования на животных биологических эффектов инновационных полимерных нанобиоконструкций, содержащих наносеребро в природной матрице АГ и синтетической ПВТ, позволила выявить особенности нарушения клеточной и субклеточной организации нейронов. Для выбора наиболее информативных показателей, определяющих уровень экспрессии апоптоз-регулирующих белков был проведен дискриминантный анализ, по результатам которого определено расположение групп в признаковом пространстве. Установлено, что наиболее отличающимися по дифференцирующим признакам, характеризующих экспрессию апоптоз-регулирующих белков в нейронах, являлись

группы нАГ100 и нАГ500 (Рисунок 5). Между группами контроля, АГ и КС не выявлено четкой дискриминации.

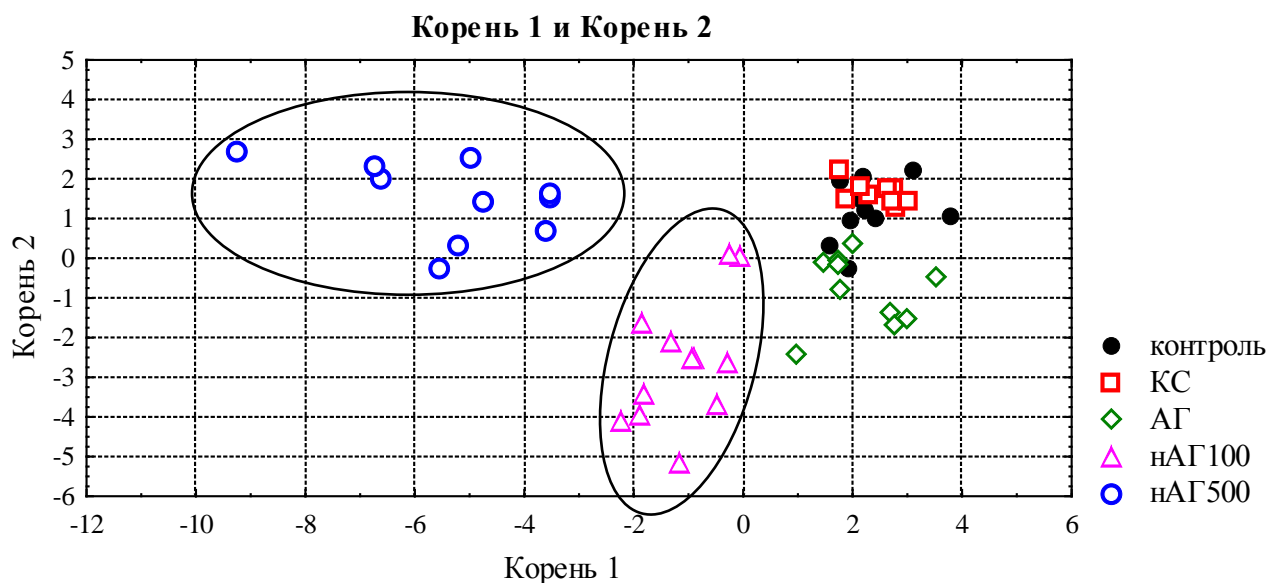


Рисунок 5 - Распределение групп экспонированных АГ и нанокompозитами на его основе и контрольной группы в координатах первой и второй канонических дискриминантных функций.

В то время как при проведении дискриминантного анализа аналогичных показателей групп, экспонированных ПВТ, нанокompозитами на его основе, КС и контрольной группы не выделена какая-либо группа животных, отличающихся по дифференцирующим признакам. Группы дискриминировали между собой не достаточно отчетливо, имелись значительные области перекрытия с группами сравнения (контроль, КС и ПВТ) (Рисунок 6).

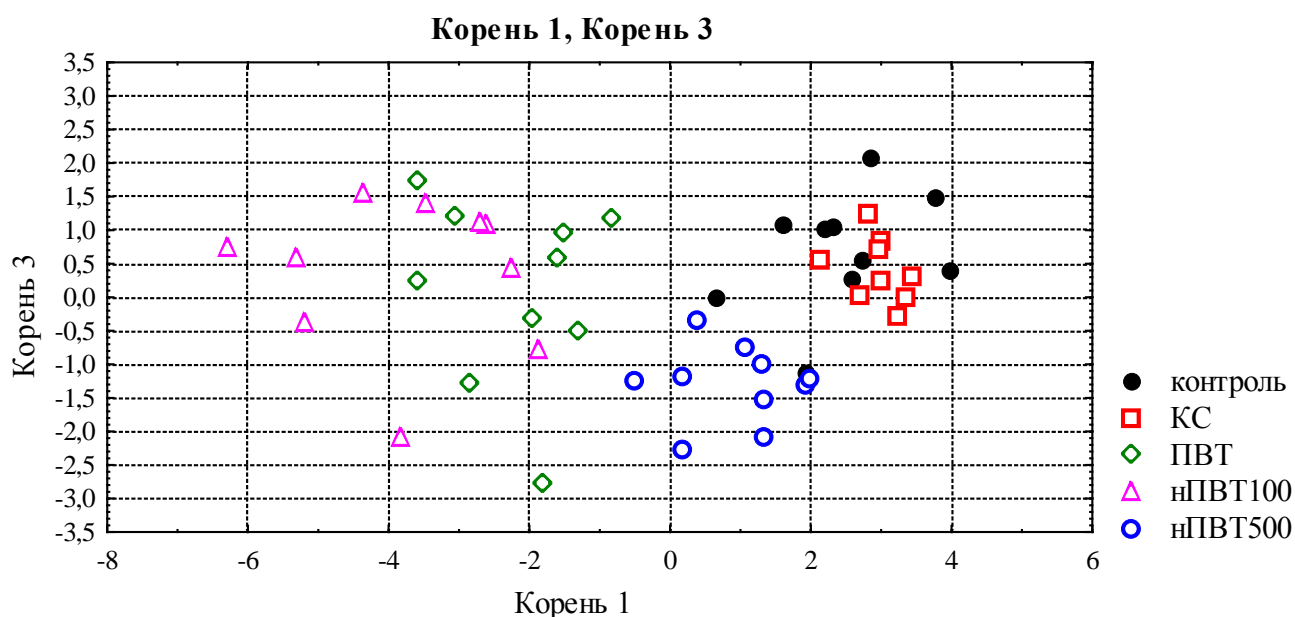


Рисунок 6 - Распределение групп экспонированных ПВТ и нанокompозитами на его основе и контрольной группы в координатах первой и третьей канонических дискриминантных функций

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами исследования позволяют высказать утверждение, что нельзя токсичность наноструктурированных препаратов рассматривать, используя только методы классической токсикологии. К сожалению, традиционные подходы для оценки токсичности химических веществ недостаточны для веществ в нанофазе, так как методология изучения биологических свойств наночастиц, основанная на принципах определения стандартных параметров токсикометрии, не всегда обеспечивает безопасность наноструктурированных препаратов. Развивающаяся при этом ответная реакция основных регулирующих систем, не всегда укладывается в прямолинейную классическую зависимость «доза-эффект». При изучении интегральной ответной реакции организма экспериментальных животных на введение нАГ с позиций классической токсикологии нами установлено повышение активности процессов антиоксидантной системы (SH-глутатиона, каталазы), отсутствие изменений в системе перекисного окисления липидов. При изучении среднесмертельной дозы нАГ нанокompозит отнесен по параметрам токсикометрии к 4 малоопасному классу веществ, имеющим DL50 при внутрижелудочном введении более 5000 мг/кг массы животного. Однако результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о наличии нейротоксических эффектов наночастиц серебра проявляющихся даже в низких дозах за счёт способности их проникать через ГЭБ. Возникающие при этом изменения клеточной и субклеточной организации нейронов могут лежать в основе формирования патологии нервной системы. В связи с вышеизложенным относить нанобиокompозит нАГ к малоопасным веществам представляется, по меньшей мере, необоснованным и преждевременным. Нами научно обоснован алгоритм по оценке нейротоксичных свойств нанобиокompозитов, содержащих наносеребро, позволяющий выявлять нарушения на клеточном и субклеточном уровнях. Осмысление полученных результатов экспериментального моделирования позволило на основе анализа процесса апоптоза определить наиболее информативные иммуногистохимические критерии токсического поражения головного мозга белых крыс при воздействии нАГ. Технология оценки безопасности нанокompозитов, основанная на морфологическом анализе структурных изменений внутренних органов и тканей организма и молекулярной диагностике экспрессии внутриклеточных белков, позволит не допускать к производству и применению лекарственные формы и диагностические препараты, способные вызывать неблагоприятные изменения в состоянии здоровья, в том числе и отдаленные последствия воздействия.

ВЫВОДЫ

1. Изучаемые нанобиокompозиты, содержащие наносеребро, конъюгированное как на природной, так и синтетической полимерной матрице отнесены по параметрам токсикометрии к 4 малоопасному классу веществ, имеющему DL50 при внутрижелудочном введении более 5000 мг/ кг массы животного.
2. Сравнительная оценка в модельных экспериментах на животных биологических эффектов инновационных полимерных нанобиокompозитов, содержащих наносеребро в природной матрице - арабиногалактан и синтетической - поли - 1 - винил - 1,2,4 – триазол, выявила нарушения клеточной и субклеточной организации нейронов, только при введении нанобиокompозита на природной матрице-арабиногалактан.
3. Наночастицы серебра, инкапсулированные в природную биополимерную матрицу - арабиногалактан, способны проникать через гематоэнцефалический барьер и длительно сохраняться в нервной ткани головного мозга крыс.
4. Патоморфологические исследования коры головного мозга крыс подтверждают нейротоксическое действие нанобиокompозита на природной матрице-арабиногалактан. Ранний период воздействия характеризуется расширением

периваскулярных пространств, очаговым набуханием проводящих волокон в коре головного мозга, появлением тёмных нейронов, нейрофагией, увеличением площади митохондрий. В отдаленный период воздействия выявленные морфологические изменения усиливаются с формированием большого количества тёмных нейронов, утолщением стенки артерий, набуханием эпителиоцитов и миоцитов сосудов.

5. Следствием действия наночастиц серебра, инкапсулированных в природную полимерную матрицу - арабиногалактан, является увеличение экспрессии регуляторных белков апоптоза bcl-2 и caspase-3 в нейронах уже на десятый день после воздействия нанобиокомпозиата.

6. В отдаленном периоде обследования при введении наночастиц серебра, инкапсулированных в природную полимерную матрицу – арабиногалактан, наблюдается повышение количества нейронов, экспрессирующих bcl-2, однако активности последнего недостаточно для предотвращения процесса апоптоза нейронов и формирования внутриклеточных защитных механизмов. При этом количество клеток с индукцией caspase-3 в нейронах также значительно возрастает, превышая соответствующие значения контрольной группы и группы, получившей матрицу-арабиногалактан (соответственно в группе НАГ100 – в 6,1 и 7,9 раза, а в группе НАГ500 в 4,8 и в 6 раз), что характеризует активный апоптотический процесс.

7. Полимерная матрица на основе природного биополимера арабиногалактана является перспективным соединением в качестве контейнера для адресной доставки лекарственных и диагностических препаратов в нервную ткань головного мозга.

8. Разработанный алгоритм по изучению нейротоксичных свойств нанобиокомпозиатов на клеточном и субклеточном уровнях включает возможность оценки нарушений морфологической структуры головного мозга у крыс, выраженности экспрессии белков модуляторов апоптоза bcl-2 и caspase-3 в нейронах головного мозга и послужит базой для биологического скрининга инновационных медицинских нанобиокомпозиатов.

Научно-практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

При экспериментальной оценке безопасности нанобиокомпозиатов в программу исследований следует включать оценку биологических эффектов на клеточном и субклеточном уровнях, а также ответную реакцию организма в отдаленном периоде действия.

Результаты выполненных исследований рекомендуется использовать:

- для разработки критериев безопасности при доклинической оценке лекарственных и диагностических препаратов, содержащих наночастицы серебра, предлагаемых для антимикробного фармакологического применения;
- для выработки согласованных подходов к использованию перспективных инновационных нанобиокомпозиатов в качестве лекарственных антимикробных препаратов.

Разработанный алгоритм по оценке нейротоксичности нанобиокомпозиатов, содержащих наносеребро, позволит ускорить скрининг инновационных лекарственных форм, планируемых к использованию в качестве диагностических и лекарственных препаратов.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук:

1. **Новиков, М.А.** Биологические эффекты нового серебросодержащего полимерного нанокompозита / **М.А. Новиков**, Е.А. Титов, В.А. Вокина, Н.Л. Якимова и др. // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. - 2012. - № 2, Ч. 2. - С. 121-125.
2. Чайка, В.В. Морфологическая оценка влияния разных типов углеродных нановолокон на некоторые внутренние органы (почки, селезенка) крыс линии Вистар / В.В. Чайка, Н.В. Саяпина, Т.А. Баталова, **М.А. Новиков** // Известия Самарского научного центра РАН. - 2014. - Т. 16, № 5 (4). - С. 1247-1250.
3. **Новиков, М.А.** Реакция белых крыс при внутрижелудочном введении вновь синтезированного нанобиокompозита на основе частиц Ag(0) и арабиногалактана / **М.А. Новиков**, Е.А. Титов, Л.М. Соседова, Л.А. Остроухова и др. // Химико-фармацевтический журнал. - 2014. - Т. 48. - № 6. - С. 33-36.
4. Соседова, Л.М. Морфофункциональная оценка эффектов действия наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу / Л.М. Соседова, **М.А. Новиков**, Е.А. Титов // Микроэлементы в медицине. - 2014. - Т. 15. - № 4. - С. 39-43.
5. Титов, Е.А. Экспрессия bcl-2 как критериальный показатель воздействия нанобиокompозитов / Е.А. Титов, **М.А. Новиков** // Токсикологический вестник. - 2014. - № 4. - С. 34-38.
6. Прозорова, Г.Ф. Токсикологические свойства поливинилтриазола и серебросодержащего нанокompозита на его основе / Г.Ф. Прозорова, А.С. Поздняков, С.А. Коржова, **М.А. Новиков** и др. // Известия Академии наук. Серия химическая. - 2014. - № 9. - С. 21-26.
7. Саяпина, Н.В. Экологическая и токсикологическая опасность углеродных нанотрубок: обзор российских публикаций / Н.В. Саяпина, А.А. Сергиевич, Т.А. Баталова, **М.А. Новиков** и др. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2014. - Т. 16, № 5 (2). - С. 949-953.
8. **Novikov, M.A.** Biochemical and morphological changes in white rats after intragastric injection of a synthetic nanobiocomposite based on silver nanoparticles and arabinogalactan / **M.A. Novikov**, E.A. Titov, L.M. Sosedova, L.A. Ostroukhova et al. // Pharmaceutical Chemistry Journal. - 2014. - Т. 48. - № 6. - P. 387-390.
9. Prozorova, G. F. Toxicity evaluation of polyvinyltriazole and a related silver-containing nanocomposite / G. F. Prozorova, A. S. Pozdnyakov, S. A. Korzhova, T. G. Ermakova, **M. A. Novikov**, E. A. Titov, L. M. Sosedova // Russian Chemical Bulletin, International Edition. - 2014. - Vol. 63. - № 9. - P. 2126—2129.
10. Соседова, Л.М. Активность апоптоза в нервной ткани белых крыс при воздействии арабиногалактана наносеребра / Л.М. Соседова, Е.А. Капустина, **М.А. Новиков** // Токсикологический вестник. - 2015. - № 6. - С. 27-31.
11. Соседова, Л.М. Оценка биологических эффектов воздействия наносеребра на ткань головного мозга экспериментальных животных / Л.М. Соседова, **М.А. Новиков**, Е.А. Титов, В.С. Рукавишников // Медицина труда и промышленная экология. - 2015. - № 4. - С. 26-30.
12. Титов, Е.А. Альтерация ткани головного мозга белых крыс, индуцированная воздействием нанокompозита серебра, инкапсулированного на полимерной матрице / Е.А. Титов, Л.М. Соседова, **М.А. Новиков** // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2015. - Том 59. - № 4. - С. 41-44.

13. Титов, Е.А. Влияние наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу, на структуру нервной ткани и экспрессию caspase-3 / Е.А. Титов, **М.А. Новиков**, Л.М. Соседова // Российские нанотехнологии . – 2015. - № 7-8 (10). – С. 105-108.
14. Titov, E. A. Effect of silver nanoparticles encapsulated in a polymer matrix on the structure of nervous tissue and expression of caspase-3 / E. A. Titov, **M. A. Novikov**, L. M. Sosedova // Nanotechnologies in Russia. - 2015. - Vol. 10. - № 7–8. - P. 640–644.
15. Соседова, Л.М. Особенности экспрессии апоптоз-регулирующих белков в нейронах белых крыс при воздействии наносеребра, инкапсулированного в полимерную матрицу / Л.М. Соседова, **М.А. Новиков**, Е.А. Титов // Токсикологический вестник. – 2016. - № 6. – С. 48 – 54.
16. Титов, Е.А. Способ оценки токсического действия наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу арабиногалактана, на ткань головного мозга лабораторных животных в отдаленном периоде воздействия / Е.А. Титов, **М.А. Новиков**, Л.М. Соседова // Изобретения. Полезные модели. Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. - 2016. - № 9.
17. Титов, Е.А. Экспрессия белков caspase-3 и bcl-2, как показатель функционального состояния ткани головного мозга белых крыс при воздействии аргентумарабиногалактан / Е.А. Титов, **М.А. Новиков**, Л.М. Соседова // Медицина труда и промышленная экология. – 2016. - № 5. - С. 40 – 43.

Статьи в научных сборниках и периодических научных изданиях:

18. **Новиков, М.А.** Морфологические изменения структуры нервной ткани белых крыс при введении полимерного нанокompозита / **М.А. Новиков** // Матер. Всероссийской Байкальской науч.-практич. конф. молодых ученых и студентов с междунар. участием «Актуальные вопросы современной медицины». – Иркутск, 2012. - Часть 2. - С.25-26.
19. **Новиков, М.А.** Оценка морфологических изменений структуры нервной ткани белых крыс при введении полимерного нанокompозита / **М.А. Новиков** // Матер. I Всеросс. конф. учёных-медиков «Инновационные технологии в медицине XXI века». – Москва. - 2012. – С. 307-309.
20. **Новиков, М.А.** Иммуногистохимическое исследование белка апоптоза bcl-2 при пероральном введении наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу / **М.А. Новиков** // Сборник тезисов VI Всероссийского с международным участием Конгресса молодых учёных-биологов «Симбиоз-Россия», 19-23 августа 2013г. – Иркутск. - 2013. - С. 433-434.
21. Соседова, Л.М. Биомоделирование при токсических воздействиях / Л.М. Соседова, Е.А. Капустина, Е.А. Титов, **М.А. Новиков** и др. // IV съезд токсикологов России – Москва. - 2013. - С. 440-443.
22. **Novikov, M.A.** Expression of apoptosis protein bcl-2 in nerve cells induced by silver nanoparticles encapsulated in polymer matrix / **M.A. Novikov** // Second International School-Conference «Applied Nanotechnology & Nanotoxicology» – Listvyanka. - 2013. - P. 97-98.
23. **Новиков, М.А.** Морфологическое исследование головного мозга при пероральном введении серебросодержащего полимерного нанокompозита / **М.А. Новиков** // Материалы II Всероссийской научной интернет-конференции с международным участием «Нанотехнология в теории и практике», - Казань. - 2014. - С. 124-126.
24. Соседова, Л.М. Оценка эффектов действия серебросодержащего нанобиокompозита на основе природной полимерной матрицы / Л.М. Соседова, Е.А. Титов, **М.А. Новиков** // Материалы VIII Московского Международного Конгресса

Биотехнология: состояние и перспективы развития. ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. - 2015. - С. 51-52.