DOI: 10.29413/ABS.2019-4.2.19

# Сравнительная оценка активности белков апоптоза при воздействии на головной мозг металлсодержащих полимерных нанокомпозитов

## Новиков М.А., Титов Е.А.

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» (665827, г. Ангарск, а/я 1170, Россия)

Автор, ответственный за переписку: Новиков Михаил Александрович, e-mail: novik-imt@mail.ru

## Резюме

Обоснование. Актуальной задачей современной токсикологии является поиск и внедрение адекватных методик оценки безопасности внедряемых в настоящее время лекарственных и диагностических препаратов, содержащих наночастицы металлов. К числу таких препаратов можно отнести субстанции, содержащие наночастицы биогенных металлов – серебро, висмут и гадолиний, которые инкапсулированы в природную биополимерную матрицу арабиногалактана, выделяемого из лиственницы сибирской. Цель исследования: сравнительная оценка активности белков – регуляторов апоптоза при воздействии нанокомпозитов, состоящих из наночастиц металлов (серебра, висмута и гадолиния) на природной матрице арабиногалактан.

**Методы.** Было проведено сравнительное иммуногистохимическое исследование белка активатора апоптоза caspase-3 и ингибитора апоптоза bcl-2 в нейронах теменно-височной коры головного мозга белых крыс, экспонированных указанными нанокомпозитами в течение 9 дней в дозе 500 мкг металла на 1 кг массы тела животного. Введение субстанций осуществлялось перорально с помощью атравматичного зонда. Статистическую обработку при оценке результатов исследования производили с помощью программы Statistica 6.1 с применением методики Манна – Уитни.

Результаты. По результатам исследования выявлено, что активация апоптотического процесса происходит лишь при воздействии нанокомпозита с добавлением наночастиц серебра, реализующаяся в достоверном увеличении процентного содержания всех типов исследуемых нейронов. При воздействии нанокомпозита с добавлением наночастиц гадолиния наблюдаются разнонаправленные результаты, характеризующие данную субстанцию как избирательно токсичную. Исследование нанокомпозита с добавлением наночастиц висмута не выявило каких-либо статистически значимых изменений Заключение. Полученные данные позволяют предложить в качестве критерия для оценки безопасности введения наночастиц, инкапсулированных на матрице АГ, показатель готовности клеток к апоптозу,

Ключевые слова: anonmos, apабиногалактан, головной мозг, наночастицы металлов

определяемый по экспрессии эффекторных белков caspase-3 и bcl-2.

**Для цитирования:** Новиков М.А., Титов Е.А. Сравнительная оценка активности белков апоптоза при воздействии на головной мозг металлсодержащих полимерных нанокомпозитов. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(2): 138-141. doi: 10.29413/ABS.2019-4.2.19

# Comparative Evaluation of the Expression of Apoptosis Proteins at the Influence of Metal Containing Polymeric Nanocomposites on the Brain

Novikov M.A., Titov E.A.

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research (POB 1170, Angarsk 665827, Russian Federation)

Corresponding author: Mikhail A. Novikov, e-mail: novik-imt@mail.ru

# **Abstract**

**Background.** The creation and the attempt to introduce into medicine new nanostructured materials dictate the need for careful study of their safety for human health and the environment. At the same time, the existing classical approaches to safety assessment do not always objectively reflect the real state of affairs; therefore, there is a need to introduce new approaches, including methods of intracellular safety assessment of nanoparticles and nanomaterials. **The aim** of this study was to evaluate expression level of apoptosis-regular proteins caspase-3 and bcl-2 in neurons of white outbred rats exposed to nanocomposites consisting of nanoparticles of metals (silver, bismuth and gadolinium) on a natural matrix of arabinogalactan isolated from Siberian larch wood.

Materials and methods. Sixty outbred male rats were exposed to nanocomposites for 9 days at a dose of 500  $\mu$ g of metal per 1 kg of animal body weight. The introduction of substances was carried out orally using atraumatic probe. Study of the activity of proteins of apoptosis modulators caspase-3 and bcl-2 and calculate the percentage of different types of reacted neurons was conducted. Statistics 6.1 was used to process results, p-values less than 0.01 were acknowledged as statistically significant.

**Results.** It was found that the activation of apoptotic process occurs only when the nanocomposite is affected with the addition of silver nanoparticles, which are realized in a significant increase in the percentage of all types of neurons under study.

**Conclusion.** Monitoring proteins – regulators of apoptosis can serve as a marker of early damage to nerve cells, since glial cells can form at the site of dead neurons that do not fulfill the main function of transmission of nerve impulses. The results obtained allow us to substantiate the need for a more thorough and prolonged study of silver nanoparticles encapsulated on the arabinogalactan matrix.

Key words: apoptosis, arabinogalactan, brain, metal nanoparticles

**For citation:** Novikov M.A., Titov E.A. Comparative Evaluation of the Expression of Apoptosis Proteins at the Influence of Metal Containing Polymeric Nanocomposites on the Brain. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(2): 138-141. doi: 10.29413/ABS.2019-4.2.19

### ОБОСНОВАНИЕ

В связи с развитием нанотехнологической отрасли в биологии и медицине, в настоящее время активно развиваются исследования и разработки, направленные на синтез и применение препаратов, содержащих полимеры и биогенные металлы в наноразмерной форме в лечебных и диагностических целях. Специалистами института химии им. А.Е. Фаворского ИНЦ СО РАН синтезирована субстанция, состоящая из носителя наночастиц – природного полимера арабиногалактана (АГ), а также функциональных агентов, внедрённых в носитель – наночастицы биогенных металлов (серебро, висмут и гадолиний), которые в макроформе широко применяются в диагностике и медицине [1, 2].

АГ – полимер, выделяемый из древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica*), имеющий разветвлённое строение с молекулярной массой 40 кДа. Установлено, что он обладает иммуномодулирующими и гепатопротекторными свойствами, не токсичен [3].

С учётом перспективы использования данных нанокомпозитов в качестве инновационных медицинских и диагностических препаратов, их эффективное применение невозможно без предварительной оценки их внутриклеточных эффектов, в том числе готовности клеток к апоптозу, как одному из параметров токсикологического исследования. При этом целесообразно исследование активности ключевых белков – регуляторов апоптоза caspase-3 и bcl-2.

# ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительная оценка активности белков – регуляторов апоптоза caspase-3 и bcl-2 в нейронах головного мозга лабораторных животных, экспонированных нанокомпозитами, состоящими из наночастиц серебра, висмута и гадолиния в матрице АГ.

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Схема синтеза металлсодержащих нанокомпозитов идентична для всех изучаемых в данном исследовании металлов и заключается в восстановлении оксида или диоксида элемента (серебро, висмут или гадолиний) при помощи боргидрида натрия в водном растворе галактозосодержащего полисахарида при комнатной температуре с образованием атомов элемента в нулевой степени окисления [4]. Полученные образцы содержали наночастицы серебра, висмута и гадолиния с преобладающим размером 4–8 нм, сферической формы, в нульвалентном состоянии хорошо визуализировались в просвечивающем электронном микроскопе.

В экспериментальных исследованиях были задействованы 60 половозрелых самцов белых беспородных крыс массой 250–290 г, выращенных в виварии ФГБНУ ВСИМЭИ (ветеринарное удостоверение 238 № 0019943 от 23 мая 2018 г.). Животные содержались в специальном помещении с 12-часовой светлой/тёмной фазой с 19 часов вечера до 7 часов утра, при температуре  $22 \pm 1\,^{\circ}$ С и влажности воздуха  $55 \pm 5\,\%$ , а также со свободным доступом к чистой водопроводной воде и пище. Группы подбирались в соответствии с методическими рекомендациями Роспотребнадзора [5], которые диктуют необходимость

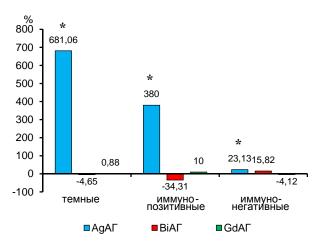
формирования группы животных, получающих чистый субстрат, без добавления наночастиц, в нашем случае – АГ. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с принятыми и действующими соглашениями об этическом отношении к лабораторным животным, а также с решением Локального этического комитета ФГБНУ ВСИМЭИ (протокол № 5 от 14.11.2012 г.). Животные были поделены на 5 групп, по 12 особей в каждой. Животным групп AgAГ, BiAГ и GdAГ вводили водный раствор нанокомпозита с добавлением серебра (Ag), висмута (Bi) и гадолиния (Gd) соответственно из расчёта 500 мкг металла на 1 кг массы животного. В качестве групп сравнения были выбраны группы контроля, особи которой получали по 0,5 мл дистиллированной воды, и группа АГ, в которой животные получали арабиногалактан без добавления наночастиц металлов в дозе, эквивалентной введению нанокомпозитов. Введение исследуемых нанокомпозитов осуществлялось перорально атравматическим зондом в течение 9 дней. На следующий день после окончания воздействия исследуемыми субстанциями животных выводили из эксперимента путём декапитации под лёгким эфирным наркозом.

Депарафинизацию срезов и подготовку образцов для исследования также проводили по общепринятой методике [6]. Полученные на микротоме срезы были помещены на полизиновые стёкла («Menzel», Германия) и окрашены на антитела к белку caspase-3 («Monosan», Нидерланды) в соответствии с протоколом, предложенным производителем, модифицированным данными, описанными в статье Sergeeva с соавт. [7]. Полученные образцы исследовались при помощи светооптического исследовательского микроскопа Olympus BX 51 (Япония) с вводом микроизображений в компьютер при помощи камеры Olympus (Япония). Далее с помощью компьютерной программы анализа изображений «Image Scope S» (Россия, Москва) было проанализировано количество нейронов разных типов: иммунопозитивные (окрашенные на антитела к белкам клетки), иммунонегативные (неокрашенные клетки), тёмные (резко окрашенные клетки без чётко выделенного ядра, зачастую уменьшенные в объёме) [8].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft, USA, лиц. No AXXR004E642326FA) по методике Манна – Уитни. Нулевые гипотезы об отсутствии различий между группами отвергали при достигнутом уровне значимости  $p \le 0,01$ .

# **РЕЗУЛЬТАТЫ**

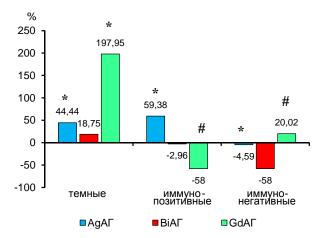
Всего было проанализировано 1800 микрофотографий, на каждой подсчитано количество тёмных, иммунопозитивных и иммунонегативных нейронов. Исследование активности белка саѕраѕе-3 показало, что при введении АдАГ наблюдалось статистически значимое по сравнению с группой АГ увеличение процентного содержания всех типов исследуемых клеток, в особенности темных (погибших) нейронов (+621,06%). При воздействии ВіАГ и GdAГ наблюдались разнонаправленные изменения процентного содержания всех типов клеток, не имеющие статистической значимости (рис. 1).



**Рис. 1.** Активность белка caspase-3 в нейронах белых крыс при воздействии АдАГ, ВіАГ, GdAГ. \* – различия статистически значимы по сравнению с группой АГ при  $p \le 0.01$ .

**Fig. 1.** Expression of caspase-3 protein in neurons of white rats exposed by AgAG, BiAG, GdAG. \* – differences are statistically significant with AG group at  $p \le 0.01$ .

При исследовании активности антиапоптотического белка bcl-2 при введении AgAГ, аналогично caspase-3, наблюдалось увеличение процентного содержания тёмных и иммунопозитивных нейронов, однако оно было менее выраженным. В случае с ВіАГ наблюдалось увеличение тёмных нейронов и небольшое снижение иммунопозитивных нейронов, не имеющее статистической значимости. При воздействии GdAГ наблюдалось достоверное увеличение количества темных и снижение количества иммунопозитивных нейронов, имеющее характер тенденции (рис. 2).



**Рис. 2.** Активность белка bcl-2 в нейронах белых крыс при воздействии AgAГ, ВіАГ, GdAГ. \* — различия статистически значимы по сравнению с группой АГ при  $p \le 0,01$ ; # — различия имели характер тенденции при сравнении с группой АГ при  $p \le 0,01$ .

**Fig. 1.** Expression of bcl-2 protein in neurons of white rats exposed by AgAG, BiAG, GdAG. \* – differences are statistically significant with AG group at  $p \le 0.01$ ; # – differences had a tendency pattern with the AG group at  $p \le 0.01$ .

# **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

При сопоставлении результатов иммуногистохимического исследования активности белков-модуляторов caspase-3 и bcl-2 наблюдается активация апоптотического процесса только в группе AgAГ, поскольку увеличение

активности саspase-3 относится к числу пусковых реакций биохимического механизма, приводящего к программированной смерти клетки [9]. Большое число погибших нейронов с увеличенной активностью caspase-3 даёт нам возможность предположить, что именно апоптоз стал причиной гибели этих клеток. В группе ВіАГ не было обнаружено достоверных изменений. В случае с GdAГ при исследовании bcl-2 можно говорить об избирательном действии данного нанокомпозита на нервные клетки. Результаты не укладываются в логическую стратегию, поскольку наряду с повышением процентного содержания тёмных нейронов, наблюдается снижение содержания иммунопозитивных нейронов, имеющее характер тенденции.

Таким образом, мы считаем, что только при воздействии AgAГ наблюдалось повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий, при этом происходило высвобождение растворимых белков, участвующих в апоптозе, в том числе белка caspase-3, и происходила активация каспазного цикла. В это же время в процесс вступали антиапоптотические белки bcl-2, содержащие 4 ВН-домена, однако, исходя из результатов исследования, их активности было недостаточно, чтобы предотвратить развитие каспазного цикла. В дальнейшем «тёмные» (погибшие) нейроны будут замещены глиальными клетками с развитием глиоза и формированием нейродегенеративного процесса, поэтому необходимы дальнейшие пролонгированные исследования.

Статья подготовлена по результатам исследований, финансируемых в рамках интеграционного проекта «Фундаментальные исследования и прорывные технологии как основа опережающего развития Байкальского региона и его межрегиональных связей» (Направление 2 — «Инновационные материалы и технологии, в том числе оборонного назначения, органический синтез, фармацевтика и медицинская химия», Часть 2.1: «Новые высокоэффективные наноструктурированные биосовместимые средства для тераностики и иммунопрофилактики, инновационные вакцины и природные биологически активные вещества»), а также по результатам исследований, финансируемых в рамках государственного задания.

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1. Плотникова Е.Ю., Сухих А.С. Препараты висмута в практике врача. *Лечащий врач*. 2016; (2): 60-61.
- 2. Свиридов Н.К., Якобс Л.В., Шимановский Н.Л. Цифровая субтракционная МРТ головного мозга с гадолинием: метод снижения контрастного вещества (обзор литературы). *Медицинская визуализация*. 2003; (2): 99-100.
- 3. Джиоев Ю.П., Юринова Г.В., Сухов Б.Г., Попкова С.М., Ганенко Т.В., Погодаева Н.Н., и др. Гемицеллюлозы и их нанобиокомпозиты перспективные наноструктурированные синбиотики. *Acta biomedica scientifica*. 2012; 5(87): 210-212.
- 4. Сухов Б.Г., Александрова Г.П., Грищенко Л.А., Феоктистова Л.П., Сапожников А.Н., Пройдакова О.А. Нанокомпозиты благородных металлов на основе арабиногалактана: получение и строение. *Журнал структурной химии*. 2007; 48(5): 979-984.
- 5. Оценка безопасности наноматериалов: Методические рекомендации. М.: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2007.
- 6. Коржевский Д.Э. *Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов.* СПб.: Кроф; 2005.

- 7. Сергеева Т.Ф., Шиманова М.В., Загайнова Е.В., Лукьянов К.А. Современные методы исследования апоптотической гибели клеток (обзор). Современные технологии в медицине. 2015; 7(3): 172-182. doi.org/10.17691/stm2015.7.3.21
- 8. Гайкова О.Н. Морфологические проявления общепатологических процессов в нервной системе. СПб.: BECb; 2015.
- 9. Сизова Е.А., Мирошников С.А., Полякова В.С., Лебедев С.В., Глущенко Н.Н. Наночастицы меди модуляторы апоптоза и структурных изменений в некоторых органах. *Морфология*. 2013; 144(4): 47-52.

### **REFERENCES**

- 1. Plotnikova EYu, Sukhikh AS. Bismuth preparations in the practice of a doctor. *Lechashchiy vrach*. 2016; (2): 60-61. (In Russ.)
- 2. Sviridov NK. Yakobs LV., Shimanovsky NL. Digital subtractive MRI of the brain with gadolinium: a method of reducing the contrast medium (review of the literature). *Meditsinskaya vizualizatsiya*. 2003; (2): 99-100. (In Russ.)
- 3. Dzhioev YuP, Yurinova GV, Sukhov BG, Popkova SM, Ganenko TV, Pogodaeva NN, et al. Hemicelluloses and their nanobiocomposites promising nanostructured synbiotics. *Acta biomedica scientifica*. 2012; 5(87): 210-212. (In Russ.)

- 4. Suhov BG, Aleksandrova GP, Grishchenko LA, Feoktistova LP, Sapozhnikov AN, Projdakova OA. Nanocomposites of noble metals based on arabinogalactan: production and structure. *Zhurnal strukturnoy khimii*. 2007; 48(5): 979-984. (In Russ.)
- 5. Assessment of the safety of nanomaterials: Methodological recommendations. M.: FGUZ Federal Center for Hygiene and Epidemiology of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. 2007. (In Russ.)
- 6. Korzhevsky DE. Summary of the basics of the histological technique for doctors and laboratory technologists-histologists. SPb.: Krof; 2005. (In Russ.)
- 7. Sergeeva TF, Shirmanova MV, Zagaynova EV, Lukyanov KA. Modern Research Techniques of Apoptotic Cell Death (Review). *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2015. 7(3): 172-182. doi. org/10.17691/stm2015.7.3.21 (In Russ.)
- 8. Gaikova ON. Morphological manifestations of general pathological processes in the nervous system. SPb.: Ves'; 2015. (In Russ )
- 9. Sizova EA, Miroshnikov SA, Polyakova VS, Lebedev SV, Glushchenko NN Copper nanoparticles modulators of apoptosis and structural changes in some organs. *Morfologiia*. 2013; 144(4); 47-52. (In Russ.)

### Сведения об авторах

Новиков Михаил Александрович — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины, ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», e-mail: novik-imt@mail.ru, http://orcid.org/0000-0002-6100-6292

Титов Евгений Алексеевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины, ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», e-mail: g57097@yandex.ru, http://orcid.org/0000-0002-0665-8060

## Information about the authors

Mikhail A. Novikov — Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Biomodeling and Translational Medicine, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, e-mail: novik-imt@mail.ru, http://orcid.org/0000-0002-6100-6292

Evgeny A. Titov — Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Biomodeling and Translational Medicine, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, e-mail: g57097@yandex.ru, http://orcid.org/0000-0002-0665-8060

Статья получена: 14.01.2019. Статья принята: 20.02.2019. Статья опубликована: 26.04.2019. Received: 14.01.2019. Accepted: 20.02.2019. Published: 26.04.2019.