

УДК 615.9

# ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ АПОПТОЗ-РЕГУЛИРУЮЩИХ БЕЛКОВ В НЕЙРОНАХ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НАНОСЕРЕБРА, ИНКАПСУЛИРОВАННОГО В ПОЛИМЕРНУЮ МАТРИЦУ

Л.М. Соседова<sup>1,2</sup>, М.А. Новиков<sup>1</sup>,  
Е.А. Титов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Ангарский государственный технический университет, 665831, г. Ангарск, Российская Федерация

Представлены результаты сравнительного анализа экспрессии апоптоз-регулирующих белков caspase-3 и bcl-2 в клетках нервной ткани беспородных белых крыс. Иммуногистохимическое исследование нервной ткани белых крыс выполняли после 9-дневного введения нанобиокомпозитов, состоящих из наночастиц серебра, инкапсулированных в матрицу из природного биополимера – арабиногалактана и синтетического – поли-1-винил-1,2,4-триазола. Обследование белых крыс проводили в 2 этапа: половину крыс из каждой группы забивали непосредственно после окончания воздействия (ранний срок) и оставшиеся крысы – через 6 месяцев после окончания воздействия (отдаленный срок). Установлено, что активность экспрессии регуляторных белков апоптоза при воздействии инновационных нанобиокомпозитов имеет свои особенности в зависимости от вводимого препарата и времени обследования. При обследовании сразу после подострого введения нанобиокомпозита – аргентумарабиногалактана (НАГ) в клетках нервной ткани головного мозга белых крыс возрастает содержание апоптотического и антиапоптотического белков caspase-3 и bcl-2. Выявленные результаты свидетельствуют об активации апоптотических процессов уже на 10-й день после окончания воздействия нанобиокомпозита. В отдаленном периоде обследования количество гиперхромных и нормальных клеток, экспрессирующих белок caspase-3, становится еще выше, что свидетельствует о нарастании с течением времени процесса апоптоза при воздействии нанобиокомпозита на природной матрице-арабиногалактан. В препаратах также выявляется значимое возрастание количества нейронов, экспрессирующих bcl-2, однако протективное действие данного белка не реализуется в полной мере. Таким образом, при сравнительной оценке биологических эффектов полимерных нанобиокомпозитов, содержащих наносеребро в природной и синтетической матрицах арабиногалактана и поли-1-винил-1,2,4-триазола установлено, что нарушения субклеточной организации нейронов возникают при введении только нанобиокомпозита на природной матрице арабиногалактан.

Анализ результатов экспрессии апоптоз-регулирующих белков при введении белым крысам аргентумполивинилтриазола (нПВТ) не выявил по сравнению с введением чистой полимерной матрицы ПВТ, каких-либо изменений, свидетельствующих об активации апоптоза в нервных клетках на протяжении всего периода наблюдений. Изменения показателей носили разнонаправленный характер, не наблюдалось повышение содержания белка bcl-2, эффективно участвующего в регуляции процесса апоптоза, равно как и повышение экспрессии белка caspase-3, свидетельствующего о необратимых изменениях в клетках при индукции апоптоза.

**Ключевые слова:** иммуногистохимия, арабиногалактан, поли-1-винил-1, 2, 4-триазол, наносеребро, апоптоз, лабораторные животные, головной мозг.

**Соседова Лариса Михайловна (Sosedova Larisa Mikhailovna)**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований»; профессор кафедры экологии и безопасности деятельности человека Ангарского государственного технического университета, 665827, г. Ангарск, Иркутской обл., Российская Федерация, sosedlar@mail.ru;

**Новиков Михаил Александрович (Novikov Mikhail Aleksandrovich)**, мл. научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, Иркутская область, г. Ангарск-27, Российская Федерация, novik-imt@mail.ru;

**Титов Евгений Алексеевич (Titov Evgeny Alekseevich)**, ст. научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, Иркутская область, г. Ангарск-27, Российская Федерация, g57097@yandex.ru

**Введение.** Важной задачей современной фармацевтики является поиск новых и модификация известных лекарственных веществ с целью улучшения их терапевтических свойств. Высокая антимикробная, антигрибковая, антивирусная активность наночастиц серебра явилась стимулом к созданию широкого спектра продуктов, включая биологически активные добавки, мази, раневые повязки, контрацептивы, хирургические инструменты и импланты [1, 2]. Актуальной проблемой при этом остается получение композитов на основе синтетических и природных полимеров в качестве матрицы, содержащей наночастицы серебра [3]. Структурная организация таких нанобиокомпозитов – серьезнейшая проблема, без решения которой трудно определить и оптимизировать области их практического использования. В Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН были синтезированы нанобиокомпозиты с инкапсулированными наночастицами серебра на природной матрице – арабиногалактан (АГ), и синтетической – поли-1-винил-1, 2, 4-триазол. (ПВТ). Синтезированные нанобиокомпозиты обладают такими благоприятными функциями, как растворимость, биосовместимость, высокая координирующая способность [4]. Применение данных нанобиокомпозитов невозможно без предварительного исследования их безопасности.

*Целью настоящих исследований* явилась сравнительная оценка экспрессии белков апоптоза в клетках головного мозга крыс в раннем и отдаленном периодах воздействия полимерных нанобиокомпозитов, содержащих наносеребро в природной – арабиногалактан и синтетической – поли-1-винил-1, 2, 4-триазол матрицах.

**Материалы и методы исследования.** В качестве исследуемых субстанций были выбраны нанобиокомпозиты, содержащие наносеребро, инкапсулированное в стабилизирующие матрицы: природный полимер арабиногалактан и синтетический – поли-1-винил-1, 2, 4-триазол. Природный наностабилизирующий полисахарид арабиногалактан представляет собой водорастворимый белый или кремовый порошок, без вкуса и запаха, состоящий из двух моносахаридов: галактозы и арабинозы [5]. Синтезированный на его основе нанобиокомпозит – аргентумарабиногалактан, по результатам исследований физико-химических параметров, содержит наночастицы серебра в нульвалентном состоянии, сферической формы с преобладающим размером 4-8, 9 нм. Содержание серебра в растворе составляет 3,1% [6]. Синтетический полимер поли-1-винил-1, 2, 4-триазол представляет собой субстанцию, способную стабилизировать наночастицы серебра в нульвалентном состоянии. Синтезированный на его основе нанобиокомпозит аргентумполи-1-винил-1, 2, 4-триазол содержит в своём составе наночастицы серебра,

которые имеют сферическую форму с преимущественным размером 2-6 нм. Содержание серебра в растворе составляет 7,03% [7].

Экспериментальные исследования проведены на базе вивария ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» на пятидесяти половозрелых беспородных белых крыс-самцах, массой от 240 до 280 грамм (в каждой группе по 10 особей). 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). Введение исследуемых нанобиокомпозитов осуществляли перорально (с помощью зонда) в течение 9 дней. Особи, сформировавшие 1 группу, являлись контрольными, им вводили по 0,5 мл дистиллированной воды. Животным 2 группы вводили «чистый» АГ, без добавления наночастиц серебра в дозе, эквивалентной введению нанобиокомпозита. Животным 3 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 (нАГ). Животные 4 группы получали в эквивалентных количествах раствор ПВТ (без наночастиц серебра). Животным 5 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 (нПВТ). Обследование белых крыс проводили в 2 этапа: непосредственно после окончания воздействия (ранний период) и через 6 месяцев после окончания воздействия (отдаленный период).

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. Для выполнения исследований нервной ткани животным проводилась эфтаназия путём 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). Далее с помощью

микротомы HM 400 (Micom, Германия) изготавливались серийные горизонтальные срезы толщиной 4-5 мкм на уровне Vregma-6,10 мм, Interaural 3,90 мм. 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 параметры анализа полученных фотоматериалов: общее количество нейронов на единицу площади, среди них – количество иммунопозитивных и иммунонегативных гиперхромных и неизмененных 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. Гиперхромными считали клетки без четко выраженного ядра, что является признаком повреждения. Количество клеток определяли на единицу площади гистологического препарата (0,2 мм<sup>2</sup>).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0» (Statsoft, США). Статистическую значимость различий в независимых выборках определяли по методу Манна – Уитни. Достигну-

тый уровень значимости признаков – при  $p < 0,01$ .

**Результаты и обсуждение.** Исследование показало, что при воздействии инновационных нанобиокомпозиций выявилось, что изменение их активности, имеет свои особенности в зависимости от вводимого препарата и времени обследования. Изучение экспрессии апоптоз-ингибирующего белкового фактора bcl-2 показало, что при введении «чистого» АГ достоверных по сравнению с контролем изменений процентного содержания всех типов исследуемых клеток по отношению к их общему количеству на площади в 0,2 мм<sup>2</sup> практически не происходит, за исключением отдельных изменений в отдаленном периоде. Однако, при введении нАГ ситуация кардинально изменяется – в ранний период обследования происходило статистически значимое как по сравнению с контролем, так и с АГ, увеличение процентного содержания иммунопозитивных и иммунонегативных к bcl-2 гиперхромных клеток (табл.1). Одновременно с этим в группах нАГ наблюдалось достоверное увеличение количества нормальных клеток с повышенным содержанием белка bcl-2 и, соответственно, снижение нормальных иммунонегативных клеток. 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 гиперхромные и нормальные иммунопозитивные к bcl-2 клетки с одновременным сокращением количества нормальных клеток без экспрессии к изучаемому белку.

Таблица 1

**Экспрессия bcl-2 при воздействии АГ и нАГ непосредственно после окончания воздействия (1 срок) и через 6 месяцев (2 срок) (% от общего количества клеток в 0.2 мм<sup>2</sup>) Med (Q25 – Q75)**

Группы	Гиперхромные иммунопозитивные клетки	Гиперхромные иммунонегативные клетки	Нормальные иммунопозитивные клетки	Нормальные иммунонегативные клетки
Контроль	0,59 (0,52-0,62) 1,65 (1,07-1,97)	1,55 (1,24-1,60) 1,63 (0,69-2,25)	2,07 (1,55-2,19) 1,42 (1,12-1,95)	97,19 (95,99-97,33) 94,80 (93,26-95,61)
АГ	0,57 (0,43-0,99) 0,45 (0,36-0,93)*	2,8 (1,56-3,45) 3,21 (2,22-3,78)	3,89 (2,46-5,92) 2,88 (2,21-3,36)*	92,96 (90,23-97,05)* 93,65 (89,74-94,96)
нАГ100	0,93 (0,53-1,68) ♦ 2,59 (2,15-3,50)* ♦	3,35 (3,10-3,74)* ♦ 3,45 (2,64-4,69)*	5,04 (4,30-5,35)* ♦ 8,05 (6,83-8,89)* ♦	90,42 (89,94-91,41)* ♦ 85,84 (84,11-88,54)* ♦

Примечание: в числителе – 1 срок обследования, в знаменателе – 2 срок обследования; \* – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при  $p < 0,01$

♦ – различия статистически значимы по сравнению с группой АГ при  $p < 0,01$ . Статистическая значимость рассчитывалась по Манна-Уитни.

При исследовании экспрессии эффекторного белка caspase-3, активирующего процесс апоптоза, при воздействии нАГ в оба периода обследования также выявлено достоверное по отношению к группе АГ изменение содержания всех типов исследуемых клеток (табл. 2).

Наблюдалось сокращение на единицу площади количества нормальных неизмененных клеток без экспрессии проапоптотического белка caspase-3. В то время как количество гиперхромных клеток и нормальных клеток, экспрессирующих caspase-3 значительно повысились. 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 гиперхромных 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.

Анализ результатов экспрессии апоптоз-регулирующих белков при введении белым крысам нПВТ не выявил по сравнению с введением чистой полимерной матрицы ПВТ, каких либо изменений, свидетельствующих об активации апоптоза в нервных клетках на протяжении всего периода наблюдений. Изменения показателей носили разнонаправленный характер, не наблюдалось повышение содержания белка bcl-2, эффективно участвующего в регуляции процесса апоптоза, равно как и повышение экспрессии белка caspase-3, свидетельствующего о необратимых изменениях

в клетках при индукции апоптоза (табл.3, 4). 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 и нПВТ достоверной разницы изучаемых показателей между собой не выявлено.

Полученный результат дал нам основание сделать вывод об идентичном воздействии нанобиокомпозиата, содержащего наносеребро в синтетической матрице ПВТ и «чистым» ПВТ на организм белых крыс. Выявленные 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.

**Заключение.** В целом при сравнительной оценке биологических эффектов полимерных нанобиокомпозиатов, содержащих наносеребро в природной и синтетической матрицах арабиногалактана и поли-1-винил-1, 2, 4-триазола установлено, что нарушения субклеточной организации нейронов возникают при введении только нанобиокомпозиата на природной матрице араби-

Таблица 2

**Экспрессия белка caspase-3 при воздействии АГ и нАГ непосредственно после окончания воздействия (1 срок) и через 6 месяцев (2 срок) (% от общего количества клеток в 0.2 мм<sup>2</sup>).  
Med (Q25–Q75)**

Группы	Гиперхромные иммунопозитивные клетки	Гиперхромные иммунонегативные клетки	Нормальные иммунопозитивные клетки	Нормальные иммунонегативные клетки
Контроль	0,68 (0,52-0,96) 1,24 (0,97-1,74)	1,68 (1,49-2,05) 1,33 (1,16-1,45)	1,93 (1,76-2,09) 1,45 (0,89-1,75)	95,52 (94,61-95,67) 95,49 (94,93-96,75)
АГ	0,33 (0,00-0,67) 0,90 (0,24-1,34)*	1,83 (1,66-2,40) 1,69 (0,00-2,21)	1,92 (1,66 -2,10) 1,10 (0,00-2,03)	96,11 (95,20-96,50) 95,53 (94,83-95,72)
нАГ100	1,10 (0,49-1,40)*♦ 3,82 (2,78-5,05)* ♦	3,20 (2,76-4,20)* ♦ 3,03 (0,85-4,80)*	4,90 (2,34-12,80)*♦ 8,89 (6,25-31,24)* ♦	87,21 (80,85-92,05)* ♦ 84,02 (59,70-86,35)* ♦

Примечание: в числителе – 1 срок обследования, в знаменателе – 2 срок обследования;

\* – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при  $p < 0,01$ ; ♦ – различия статистически значимы по сравнению с группой АГ при  $p < 0,01$ . Статистическая значимость рассчитывалась по Манна-Уитни.

Таблица 3

**Экспрессия bcl-2 при воздействии ПВТ и нПВТ непосредственно после окончания воздействия (1 срок) и через 6 месяцев (2 срок) (% от общего количества клеток в 0.2 мм<sup>2</sup>). Med (Q25 – Q75)**

Группы	Гиперхромные иммунопозитивные клетки	Гиперхромные иммунонегативные клетки	Нормальные иммунопозитивные клетки	Нормальные иммунонегативные клетки
Контроль	<u>0,59 (0,52-0,62)</u> 1,65 (1,07-1,97)	<u>1,55 (1,24-1,60)</u> 1,63 (0,69-2,25)	<u>2,07 (1,55-2,19)</u> 1,42 (1,12-1,95)	<u>97,19 (95,99-97,33)</u> 94,80 (93,26-95,61)
ПВТ	<u>1,15 (0,88-1,62)</u> 1,45 (1,27-2,68)	<u>2,86 (1,95-3,93)*</u> 3,43 (2,59-4,16)*	<u>4,18 (2,79-4,45)*</u> 4,46 (4,2-5,10)*	<u>92,62 (90,44-93,52)*</u> 88,24 (85,28-89,08)*
нПВТ100	<u>0,92 (0,42-1,11)</u> 1,54 (0,71-1,76)	<u>3,34 (2,76-3,80)*</u> 3,26 (2,29-4,55)	<u>4,66 (3,89-5,36)*</u> 4,01 (3,79-5,50)*	<u>90,83 (90,33-91,85)*</u> 86,29 (82,57-87,43)*

Примечание: в числителе – 1 срок обследования, в знаменателе – 2 срок обследования; \* – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при  $p < 0,01$ ; Статистическая значимость рассчитывалась по Манна-Уитни.

Таблица 4

**Экспрессия caspase-3 при воздействии ПВТ и нПВТ непосредственно после окончания воздействия (1 срок) и через 6 месяцев (2 срок) (% от общего количества клеток в 0.2 мм<sup>2</sup>). Med (Q25 – Q75)**

Группы	Гиперхромные иммунопозитивные клетки	Гиперхромные иммунонегативные клетки	Нормальные иммунопозитивные клетки	Нормальные иммунонегативные клетки
Контроль	<u>0,68 (0,52-0,96)</u> 1,24 (0,97-1,74)	<u>1,68 (1,49-2,05)</u> 1,33 (1,16-1,45)	<u>1,93 (1,76-2,09)</u> 1,45 (0,89-1,75)	<u>95,52 (94,61-95,67)</u> 95,49 (94,93-96,75)
ПВТ	<u>0,94 (0,50-1,43)</u> 1,41 (0,87-2,22)*	<u>2,77 (1,64-3,06)</u> 2,45 (1,60-3,20)*	<u>3,93 (3,42-4,36)*</u> 1,26 (1,01-2,36)*	<u>92,30 (90,00-93,90)*</u> 88,50 (86,56-88,97)*
нПВТ100	<u>0,93 (0,46-1,66)</u> 0,47 (0,40-0,75)	<u>3,43 (2,24-4,10)*</u> 2,22 (1,72-2,30)	<u>5,94 (2,61-15,00)</u> 2,40 (2,00-2,99)	<u>87,21 (80,85-92,06)*</u> 94,86 (93,48-95,88)

Примечания: в числителе – 1 срок обследования, в знаменателе – 2 срок обследования; \* – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при  $p < 0,01$ . Статистическая значимость рассчитывалась по Манна-Уитни.

ногалактан. Сопоставление результатов 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. 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 свой-

ствами наночастиц серебра: такими, как длительное персистирование в организме, способность к материальной кумуляции и к образованию конгломератов в структурах клетки и межклеточном пространстве [8, 9]. При этом длительное нахождение и незначительная элиминация наночастиц серебра из организма вполне вероятно способствует формированию накопленных неблагоприятных эффектов [10].

Таким образом, наночастицы серебра, инкапсулированные в природную биополимерную матрицу – арабиногалактан, способны проникать через гематоэнцефалический барьер и, длительно сохраняясь в нервной ткани головного мозга крыс, вызывать развитие процесса апоптоза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Подкопаев Д.О., Шабурова Л.Н., Баладин Г.В., Крайнева О.В., Лабутина Н.В., Суворов О.А., Сидоренко Ю.И. Сравнительная оценка антимикробной активности наночастиц серебра. Российские нанотехнологии. 2013; 8(11-12): 123-126.
2. Магомедов М.М., Рабаданов Ш.Х., Нурмагомедова П.М., Магомедова З.А., Гамзатов Г.М. Санация брюшной полости биосеребром в лечении экспериментального перитонита. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014;12(5): 51-55.
3. Рачковская Л.Н., Летягин А.Ю., Бурмистров В.А., Королев М.А., Гельфонд Н.Е., Бородин Ю.И., Коненков В.И. Модифицированные сорбенты для практического здравоохранения. Сибирский научный медицинский журнал. 2015;35(2): 47-54.
4. Шумакова А.А., Смирнова В.В., Тананова О.Н., Трушина Э.Н., Кравченко Л.В., Аксенов И.В. и др. Токсиколого-гигиеническая характеристика наночастиц серебра, вводимых в желудочно-кишечный тракт крыс. Вопросы питания. 2011; 80(6): 9-18.
5. Бабкин В.А. и др. Биомасса листовенницы: от химического состава до инновационных продуктов. Новосибирск: Изд-во СО РАН; 2011.
6. Ганенко Т.В., Костыро Я.А. и др. Патент RU 2462254 С2. Бюллетень изобретателя. 2012; 27.
7. Galina F Prozorova, Aleksandr SPozdnyakov, Nadezhda P Kuznetsova, Svetlana Akorzhova, Artem I Emel'yanov, Tamara Germakova, et al. Green synthesis of water-soluble nontoxic polymeric nanocomposites containing silver nanoparticles/International Journal of Nanomedicine. 2014; 9: 1883-1889.
8. Бузулуков Ю.П., Арианова Е.А., Демин В.Ф., Сафенкова И.В., Гмошинский И.В., Тутельян В.А. Изучение бионакопления наночастиц серебра и золота в органах и тканях крыс методом нейтронно-активационного анализа Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2011; 3: 286-289.
9. Loeschner K. et al. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. Particle and Fibre Toxicology. 2011; 8 (18). Available at:<http://www.particleandfibretoxicology.com/content/8/1/18>.
10. Asgharil, S. et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. Journal of Nanobiotechnology. 2012; 10 (14). Available at: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/14>.

## REFERENCES:

1. Podkopaev D.O., Shaburova L.N., Balandin G.V., Krayneva O.V., Labutina N.V., Suvorov O.A., Sidorenko Yu.I. Sravnitel'naya otsenka antimikrobnoy aktivnosti nanochastits serebra. Rossiyskie nanotekhnologii. 2013; 8(11-12): 123-126 (in Russian).
2. Magomedov M.M., Rabadanov Sh.Kh., Nurmagomedova P.M., Magomedova Z.A., Gamzatov G.M. Sanatsiya bryushnoy polosti bioserebrom v lechenii eksperimental'nogo peritonita. Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii. 2014; 12 (5): 51-55 (in Russian).
3. Rachkovskaya L.N., Letyagin A.Yu., Burmistrov V.A., Korolev M.A., Gel'fond N.E., Borodin Yu.I., Konenkov V.I. Modifitsirovannye sorbenty dlya prakticheskogo zdoravookhraneniya. Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal. 2015; 35 (2): 47-54 (in Russian).
4. Shumakova A.A., Smirnova V.V., Tananova O.N., Trushina E.N., Kravchenko L.V., Aksenov I.V. i dr. Toksikologo-gigienicheskaya kharakteristika nanochastits serebra, vvodimykh v zheludochno-kishechnyy trakt krys. Voprosy pitaniya. 2011; 80(6): 9-18 (in Russian).
5. Babkin V.A. i dr. Biomassa listvenitsy: ot khimicheskogo sostava do innovatsionnykh produktov. Novosibirsk: Izd-vo SO RAN; 2011 (in Russian).
6. Ganenko T.V., Kostyuro Ya.A. i dr. Patent RU 2462254 C2. Byulleten' izobretatelya. 2012; 27 (in Russian).
7. Galina F Prozorova, Aleksandr SPozdnyakov, Nadezhda P Kuznetsova, Svetlana Akorzhova, Artem I Emel'yanov, Tamara Germakova, et al. Green synthesis of water-soluble nontoxic polymeric nanocomposites containing silver nanoparticles/International Journal of Nanomedicine. 2014; 9: 1883-1889.
8. Buzulukov Yu.P., Arianova E.A., Demin V.F., Safenkova I.V., Gmoshinskiy I.V., Tutel'yan V.A. Izuchenie bionakopleniya nanochastits serebra i zolota v organakh i tkanyakh krys metodom neytronnogo aktivatsionnogo analiza Izvestiya Rossiyskoy akademii nauk. Seriya biologicheskaya. 2011; 3: 286-289 (in Russian).
9. Loeschner K. et al. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. Particle and Fibre Toxicology. 2011; 8 (18). Available at:<http://www.particleandfibretoxicology.com/content/8/1/18>.
10. Asgharil, S. et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. Journal of Nanobiotechnology. 2012; 10 (14). Available at: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/14>.

L.M. Sosedova<sup>1,2</sup>, M.A. Novikov<sup>1</sup>, E.A. Titov<sup>1</sup>.

## FEATURES OF APOPTOSIS-REGULATORY PROTEINS EXPRESSION IN NEURONS OF WHITE RATS AT EXPOSURE TO NANOSILVER ENCAPSULATED IN A POLYMER MATRIX

<sup>1</sup>East-Siberian Institute of Medical and Ecological Researches, 665827 Angarsk, Russian Federation

<sup>2</sup>Angarsk State Technical University, 665831 Angarsk, Russian Federation

Results of a comparative analysis of apoptosis-regulating proteins caspase-3 and bcl-2 expression in nerve tissue cells of outbred white rats are reported. An immunohistochemical investigation into the white rats nerve tissue was performed 9-days after administration of nano biocomposites consisting of silver nanoparticles encapsulated in a matrix of arabinogalactan, a natural biopolymer. and synthetic one – poly-1-vinyl-1,2,4-triazole. White rats were examined in 2 stages: half of the rats from each group was sacrificed immediately after exposure (early term) and the rest of rats- 6 months after the end of exposure (delayed term). It was found out that the expression activity of apoptosis regulatory protein at exposure to innovative nano biocomposites had its special features depending on a preparation administered and time of inspection. The examination immediately after subacute administration of arabinogalactan, a nano biocomposite, showed that the content of apoptotic and anti-apoptotic proteins caspase-3 and bcl-2 increased in the nerve tissue cells of white rats brain. Identified results showed activation of apoptotic processes as early as on the 10th day after the end of exposure to nano biocomposites. In a delayed examination period, a number of hyperchromic and normal cells expressing the protein caspase-3, became even higher testifying to intensification of apoptosis over time under impact of nanocomposite based on the natural matrix of arabinogalactan. A significant increase in number of neurons expressing bcl – 2 was also revealed in preparations but the protective effect of this protein was not fully realized. Thus, when comparatively assessing biological effects of polymer nano biocomposites containing nano silver in natural and synthetic matrices of arabinogalactan and poly-1-vinyl-1,2,4-triazole, it was found out that disorders in neuron subcellular organization emerge at only administration of nanobiocomposite in natural matrix of arabinogalactan. Analysis of results of expression of apoptosis-regulating proteins at administration of argentum polyvinyl triazola (PVT) to white rats did not reveal any changes as compared to administration of pure polymer matrix that could attest to activation of apoptosis in nerve cells throughout the observation period. Changes in indices had multidirectional character, an increased content of bcl-2 protein that was effectively involved in the regulation of apoptosis process was not observed, as well as increased expression of the protein caspase-3, which testified to irreversible changes in cells at apoptosis induction.

**Keywords:** immunohistochemistry, arabinogalactan, poly-1-vinyl-1,2,4-triazole, nano silver, apoptosis, laboratory animals, brain.

Материал поступил в редакцию 18.11.2016 г.