ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВОСТОЧНО-СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ
МЕДИКО-ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ»

На правах рукописи

НОВИКОВ
Михаил Александрович

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОСОБЕННОСТЕЙ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩИХ НАНОБИОКОМПОЗИТОВ

14.03.04 – токсикология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН
В.С. Рукавишников

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор
Л.М. Соседова

АНГАРСК
2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4

ГЛАВА 1. НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА – МОДУЛЯТОРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НА ОРГАНИЗМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) 12

1.1. Наночастиы серебра – перспективные объекты биомедицинских исследований 14

1.2. Апоптоз как один из возможных точек приложения воздействия нанобиокомпозитов 19

1.3. Арабиногалактан и поли-1-винил-1,2,4-триазол – перспективные полимерные матрицы для создания нанобиокомпозитов медицинского назначения 21

1.4. Методические подходы к токсико-гигиенической оценке действия наночастиц на современном этапе 25

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 31

2.1. Токсикологические методы 32

2.2. Методы морфологических и морфометрических исследований . . 34

2.3. Методы иммуногистохимического анализа 36

2.4. Изучение состояния клеточных структур методом электронной микроскопии 37

2.5. Методы статистического анализа 39

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕР НАРУШЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ АРГЕНТУМАРАБИНОГАЛАКТАНА 41

3.1. Определение среднесмертельной дозы аргентумарабиногалактана . . 41

3.2. Исследование биохимических показателей при введении аргентумарабиногалактана 42

3.3. Определение концентрации серебра во внутренних органах при введении аргентумарабиногалактана 43

3.4. Морфологическое и морфометрическое исследование коры головного мозга при воздействии аргентумарабиногалактана . . . 44

3.5. Ультраструктурный анализ нейронов коры головного мозга белых крыс при введении аргентумарабиногалактана 55

3.6. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков bcl-2 и caspase-3 при введении аргентумарабиногалактана 57

3.7. Дискриминантный анализ показателей экспрессии белков апоптоза при введении аргентумарабиногалактана 69
ГЛАВА 4. ХАРАКТЕР НАРУШЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ АРГЕНТУМПОЛИ-1-ВИНИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛА 74
4.1. Определение среднесмертельной дозы аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола 74
4.2. Определение биохимических показателей при введении аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола 74
4.3. Исследование концентрации серебра во внутренних органах при введении аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола 75
4.4. Морфологическое и морфометрическое исследование коры головного мозга при воздействии аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола 76
4.5. Ультраструктурный анализ нейронов коры головного мозга белых крыс при воздействии аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола 81
4.6. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков bcl-2 и caspase-3 при введении аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола . . 81
4.7. Дискриминантный анализ показателей экспрессии белков при введении аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола 89
ГЛАВА 5. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ НАНОБИОКОМПОЗИТОВ 93
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ПО ИЗУЧЕНИЮ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ НАНОБИОКОМПОЗИТОВ 102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 109
ВЫВОДЫ 111
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 114

ВВЕДЕНИЕ

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 биомишенями. 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. B. 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; Джиоев 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, обусловливающих 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, LD_{50}).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Нанобиокомпозит, содержащий наночастицы серебра в природной полимерной матрице арабиногалактан, относится к IV малоопасному классу веществ, имеющих LD_{50} 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 «Наноматериалы и живые системы

(Nanomaterials 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 Минобразования и науки РФ 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.

ГЛАВА 1. НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА – МОДУЛЯТОРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НА ОРГАНИЗМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Термин «нанотехнология» впервые был введён в 1974 г. Норио Танигучи, однако более близким к истине стало определение Альберта Франкса, опубликованное в 1987 г. Согласно Франксу, «нанотехнология – это производство с размерами частиц и точностями в области 0,1–100 нм» [Oberdörster G., Stone V., Donaldson K., 2007]. Согласно общепринятой классификации, наночастицы можно разделить на 3 основные группы [Лысцов В. Н., Мурзин Н. В., 2007]:

1) наночастицы на основе углерода (фуллерены, однослойные и многослойные углеродные нанотрубки);

2) наночастицы металлов (золота, серебра, меди и т. д);

3) полимерные нанокомпозиты.

Производство и использование наноматериалов в ряде стран приобрело промышленные масштабы [Thurn K. T. et al., 2007; Choi H. S., Frangioni J. V., 2010; Yang Z. et al., 2010]. Это способствует загрязнению различных объектов окружающей среды и рабочих мест наночастицами, которые в большинстве своём высокотоксичны [Фатхутдинова Л. М., Халиуллин Т. О., Залялов Р. Р., 2009; Oberdörster G. et al., 2005; Adiseshaiah P. P., Hall J. B., McNeil S. E., 2009; Ray P. C., Yu H., Fu P. P., 2009; Sayes C. M., Warheit D. B., 2009; Walker N. J., Bucher J. R., 2009; Prow T. W., 2010; Hankina S. et al., 2011; Yokel R. A., MacPhail R. C., 2011]. Решением данных проблем занимается нанотоксикология – наука, изучающая токсичность наночастиц и их потенциальный риск для здоровья населения и окружающей среды, – в связи с чем особое значение приобретают экологические и профессиональные аспекты нанотоксикологии [Проданчук Н. Г., Балан Г. М., 2009; Потапов А. И. и др., 2013; Donaldson K. et al., 2004; Ostrowski A. D. et al., 2009; Suh W. H. et al., 2009; Chwalibog A. et al., 2010; Zolnik B. S. et al., 2010; Clark K. A., White R. H., Silbergeld E. K., 2011; Lee S. B., 2011; Weiss C., Diabate S., 2011; Win-Shwe T.,

Fujimaki H., 2011]. Несмотря на то, что наноматериалы используются уже более 15 лет, ни один их представитель не изучен на предмет безопасности в достаточной мере [Хотимченко С. А., Гмошинский И. В., Тутельян А. В., 2009; Потапов А. И. и др., 2013]. Наночастицы разнообразны по химическому составу, размеру и форме, обладают различными поверхностными характеристиками, зарядом и т. д.

В последнее время быстрыми темпами развивается и наномедицина, направленная на применение наночастиц и нанотехнологий в диагностике и лечении заболеваний [Browning L. M., 2009; McNeil S. E., 2009; Cash K. J., Clark H. A., 2010; McNerny D. Q., Leroueil P. R., Baker J. R., 2010; Kuiken T., 2011; Shen B. et al., 2011; Thomas D. G. et al., 2011; Parboosing R. et al., 2012; Ranganathan R. et al., 2012; Zarbin M. A. et al., 2012].

Выделяют несколько основных областей наномедицины:

1. Адресная доставка активных лекарственных веществ.

2. Новые методы и средства лечения на наноразмерном уровне.

3. Диагностика *in vivo*.

4. Диагностика *in vitro*.

5. Применение наноматериалов в изготовлении медицинских имплантов [Berube D. M., 2009].

О развитии наномедицины свидетельствует значительный рост публикаций на эту тему в авторитетных научных журналах. Также активно растёт число патентных заявок на изобретения, что говорит о высокой степени коммерциализации данных научных исследований. Бесспорным лидером и по научным публикациям, и по патентным заявкам в области нанотехнологий являются США – оттуда приходят ежегодно около 40 % публикаций и около 60 % патентных заявок.

Из всех областей применения наномедицины особые надежды возлагаются на создание систем адресной доставки лекарственных препаратов [Liong M. et al., 2008; Jones C., Grainger D. W., 2009; Shi J. et al., 2010; Chrastina A., Massey K. A., Schnitzer J. E., 2011]. Именно данные системы имеют большое значение для лекарственных препаратов на основе белков, поскольку благодаря присоединению к протеину полимерной цепочки удаётся повысить их

эффективность, увеличив период полураспада в крови. К сожалению, несмотря на высокий потенциал эффективности, системы адресной доставки активных веществ в органы и ткани-мишени связаны и с нежелательными побочными эффектами. Уже известны случаи, когда на основе анализа данных по безопасности различных систем адресной доставки было принято решение отказаться от разработки лекарственных средств на основе стабильных наночастиц в пользу расщепляемых [Daum N. et al., 2012].

Согласно литературным данным, наночастицы, благодаря своим малым размерам, легко проникают в организм человека и животных через защитные барьеры (гемато-энцефалический барьер, эпителий, слизистые и пр.), респираторную систему, желудочно-кишечный тракт [Salata O. V., 2004; Jia G., Wang H., Tan L., 2005; Sadauskas E. et al., 2007; Suna C., Leeb J. S. H., Zhanga M., 2008; Braydich-Stolle L. K. et al., 2010; Geiser M., Kreyling W. G., 2010; Seaton A. et al., 2010; Yang X. et al., 2010; Haase A., 2011; Lehr C.-M. et al., 2011; Sung J. H. et al., 2011; Landsiedel R. et al., 2012; Stebounova L. V. et al., 2012]. Имеющийся массив данных о поступлении наночастиц в живой организм свидетельствует о том, что различные материалы при переводе их в наноформу значительно изменяют свои физико-химические свойства, что может отразиться на их физиологических эффектах [Использование методов количественного определения…, 2010; Трахтенберг И. М. и др., 2013; Unfried K. et al., 2007; Dobrovolskaia M. A., 2008; Browning L. M., 2009; Cho E. C., 2010; Griffitt R. J. et al., 2009; Alkilany A. M., Murphy C. J., 2010; BarathManiKanth S. et al., 2010; Chen H. H., Josephson L., Sosnovik D. E., 2011; Cromer Berman S. M., Walczak P., Bulte J. W. M., 2011; Dykman L. A., Khlebtsov N. G., 2011; Elavazhagan T., Arunachalam K. D., 2011; Powers C. M. et al., 2011a; Pujalté I. et al., 2011; Asghari S. et al., 2012; Cui W. et al., 2012; Elsaesser A., Howard C. V., 2012; Fakruddin M., Hossain Z., Afroz H., 2012; Mentovich E. D. et al., 2012].

1.1. Наночастицы серебра – перспективные объекты биомедицинских исследований

Серебро известно ещё с древних времён и всегда играло достаточно большую роль в жизни людей. В настоящее время его применение разнообразно и

связано с его физико-химическими свойствами. Серебро и его сплавы применяются в различных технологических процессах, биологии и медицине, производстве ювелирных изделий. На основе серебра созданы припои с уникальными эксплуатационными свойствами, позволяющие осуществлять пайку материалов, обладающих различными коэффициентами теплопроводности [Мастеров В. А., Саксонов Ю. В., 1979; Худяков И. Ф., Дорошкевич А. П., Карелов С. В., 1987; Эмсли Д., 1993; Стадников А. А. и др., 2007; Давидюк Г. Е., Юрченко О. Н., Парасюк О. В., 2008; Жукова Л. В. и др., 2005, 2008; Сизова Е. А. и др., 2011; Belharouak I., Well F., Parent C., 2001; Kartini E., Collins M. F., Lovekin C. C., 2001; Kartini E., Kenedy S. J., Sakuma T., 2002; Torres-Torres C. et al., 2010]. До недавнего времени серебро активно применялось в фотографии, ведь все соединения серебра на свету разлагаются до свободного серебра и при этом окрашиваются в серый или чёрный цвет.

Наиболее широкое применение серебра связано с медициной и уходит вглубь веков. Так, препараты серебра применялись в качестве средств лечения нервных и желудочно-кишечных заболеваний (невралгии, эпилепсии, холера, диареи). В настоящее время лекарства на его основе, такие как протаргол и коларгол, применяются при различных заболеваниях и патологиях желудочно-кишечного тракта, ЛОР-заболеваниях. Помимо этого, в лучевой терапии используются некоторые изотопы радиоактивного серебра.

Вопрос о физиологической роли серебра изучен недостаточно. В организме серебро образует соединения с белками, способно блокировать тиоловые группы ферментных систем, а также угнетать тканевое дыхание, связываться с форменными элементами крови. Также известны случаи накопления серебра в производственных условиях под кожными покровами (аргирия), в органах выведения и слизистых оболочках [Скальный А. В., 2004].

В норме основное поступление серебра в организм происходит с водой и пищевыми продуктами, а выведение – преимущественно через кишечник. Суточное поступление серебра с продуктами питания – 0,07 мг, процент резорбции в желудочно-кишечном тракте – 10 %, суточное выведение с мочой – 0,008 мг, с

калом – 0,06 мг, с потом – 0,0004 мг, через волосы и др. – 0,00065 мг. Период полувыведения из организма составляет 80–160 суток [Скальный А. В., 2004].

Среднее содержание серебра в теле млекопитающих достигает 20 мкг на 100 г сухой массы, оно содержится во всех органах и тканях. Наиболее высокие концентрации серебра наблюдаются в мозге, печени, лёгких. Среднее содержание в серебра в крови < 2,7 мг/л, из них в сыворотке, плазме крови – 0,0004–0,0012 мг/кг, в моче – 0,0003 0,001 мг/мл, в волосах – 0,005–0,2 мг/кг, в ногтях – 0,003–1,4 мг/кг, в эмали зубов – 0,004–2,2 мг/кг, в зубном дентине – 0,005–0,56 мг/кг, в костях – 1,1 мг/кг, в мышцах – 0,009–0,28 мг/кг, в печени – 5–32 нг/г. Токсическая доза для человека составляет 60 мг, летальная – 1,3–6,2 г [Скальный А. В., 2004].

Наночастицы серебра, благодаря своим бактерицидным свойствам, нашли широкое применение в пищевой промышленности, в производстве различных косметических средств, а также фильтров для очистки воды. По сравнению с серебром макроразмеров, его наночастицы могут проявлять гораздо большую токсичность. Механизм её развития связан с увеличением проницаемости клеточной мембраны и нарушением функции митохондрий, окислительным стрессом [О надзоре за продукцией, полученной…, 2007; Braydich-Stolle L. et al., 2005; Lee K. J. et al., 2007; Trickler W. J. et al., 2010; Soloviev M., 2007; AshaRani P. V., Prakash Hande M., Valiyaveettil S., 2009; Ordzhonikidze C. G. et al., 2009; Hussain S. M., Schlager J. J., 2009; Sung J. H., Ji J. H., Park J. D., 2009; Chrastina A., Schnitzer J. E., 2010; Hung-Li L., Dai S. A., Fu K.-Y., Hsu S., 2010; Kim Y. S. et al., 2010; Nallathamby P. D., Xu X.-H. N., 2010; Samberg M. E., Oldenburg S. J., Monteiro-Riviere N. A., 2010; Scown T. M., Santos E. M., Johnston B. D., 2010; Darroudi M. et al., 2011; Gorth D. J., Rand D. M., Webster T. J., 2011; Korani M. et al., 2011; Lara H. H. et al., 2011; Majeed Khan M. A et al., 2011; Maneewattanapinyo P. et al., 2011; Shameli K. et al., 2011a; Shameli K. et al., 2011b; Stebounova L. V. et al., 2011; Stevanović M. et al., 2011; Sung J. H. et al., 2011; Teodoro J. S. et al., 2011; Tkalec Z. P. et al., 2011; Zamiri R. et al., 2011; Zhao C. M., Wang W. X., 2011; Asgharil S., Johari S. A., Lee J. H., 2012; Guzman M., Dille J.,

Godet S., 2012; Irwin P. et al., 2010; Jena P. et al., 2012; Kim S., Choi I.-H., 2012; Lu R. et al., 2012; Shetty P. R. et al., 2012; Zhou Y. et al., 2012].

Ингаляционная токсичность наночастиц серебра размером 19,8–64,9 нм изучалась в течение 28 дней на крысах при воздействии в концентрациях $1{,}73 \times 10^4$, $1{,}27 \times 10^5$ и $1{,}32 \times 10^6$ частиц/см^3 [Loeschner K. et al., 2011]. Животных подвергали экспонированию на протяжении 4 недель – по 6 ч в течение 5 дней с двухдневным перерывом. Обнаружено статистически значимое увеличение γ-глютамилтрансферазы (ГГТ) в крови, повышение содержания нейтрофилов, эозинофилов и гемоглобина у женских особей при концентрации $1{,}27 \times 10^5$ частиц/см^3, увеличение кальция и общего белка в сыворотке крови у крыс обоего пола при концентрации $1{,}27 \times 10^6$ частиц/см^3. При этом наночастицы серебра обладают способностью осаждаться в лёгких, печени, почках, проникать в результате аксонального транспорта в обонятельную луковицу. На основании всех проведённых исследований по токсикокинетике учёными была составлена примерная схема путей поступления, распределения и выведения наноматериалов в организме человека (Рисунок 1.1) [Ostrowski A. D. et al., 2009].

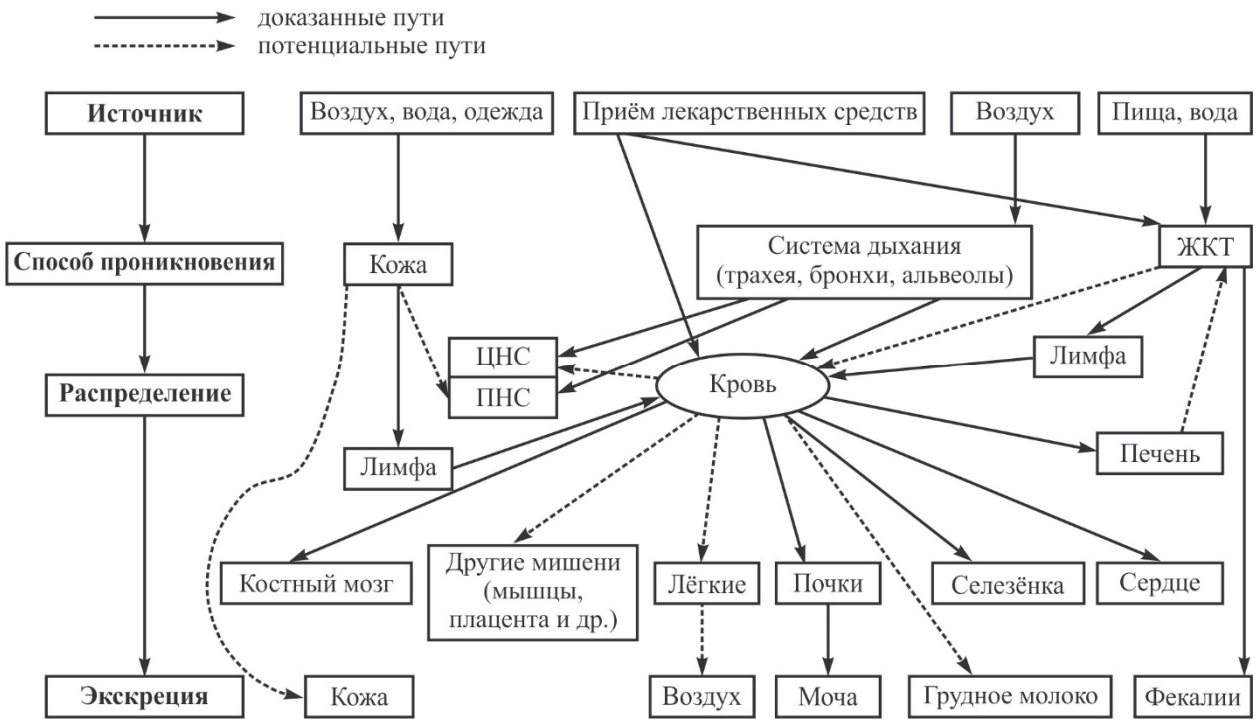

Рисунок 1.1 – Схема путей поступления, распределения и выведения наноматериалов в организме человека [Ostrowski A. D. et al.,2009]

Особая цитотоксичность наночастиц серебра выявлена при их воздействии на стволовые сперматогониальные клетки млекопитающих (предшественники сперматозоидов) и стволовые клетки, находящиеся в волосяных фолликулах.

Поражение этих структур может вызвать тотальную алопецию или даже полное отсутствие ногтевых пластинок [Braydich-Stolle L. K. et al., 2010]. Исследователи предложили использовать сперматогониальные клетки яичек 6-дневных мышей в качестве модели для оценки цитотоксичности наночастиц. Сравнительная оценка цитотоксичности наночастиц металлов (серебра, молибдена, алюминия и кадмия) при экспозиции со стволовыми клетками яичек в течение 48 ч выявила наиболее высокую токсичность у наночастиц серебра. Дополнительно исследователи докладывают о высокой стабильности наночастиц серебра в окружающей среде и способности сохранять токсические свойства на протяжении нескольких лет, что также вызывает определённую настороженность [Платонова Т. А. и др., 2013; Gwinn M. R., Tran L., 2010; Kong B. et al., 2011]. Всё это позволяет констатировать, что необходимы дальнейшие интенсивные исследования токсикодинамики и токсикокинетики наночастиц серебра, в том числе и в составе нанобиокомпозитов.

В последнее время появляются сообщения о неоднозначном влиянии наночастиц металлов и, в частности, серебра на внутриклеточные процессы апоптоза [Zhao J. et al., 2009; Ahamed M. et al., 2010; Chen H. H, Josephson L., Sosnovik D. E., 2011; Stensberg C. et al., 2011]. Известно, что механизм индукции апоптоза в клетках может быть обусловлен, в том числе, и дисбалансом про- и противоапоптотических белков. Преобладание выработки того или иного типа белков способствует либо индукции апоптоза, либо мобилизации защитных механизмов и восстановлению функционального состояния клетки. Наряду с этим, остаётся нерешённым вопрос об участии наносеребра, инкапсулированного в полимерную матрицу, во внутриклеточных механизмах апоптоза. В связи с этим считаем необходимым представить основные механизмы и ключевые элементы апоптоза, роль которых, возможно, будет определяющей при развитии в нейронах процесса программированной клеточной гибели при воздействии нанобиокомпозитов.

1.2. Апоптоз как один из возможных точек приложения воздействия нанобиокомпозитов

Апоптоз является необходимым условием нормального функционирования живого организма и представляет собой регулируемый процесс программируемой клеточной гибели. Поддержание постоянства численности клеток и обеспечение их правильного типового соотношения – за все это отвечает апоптоз.

Термин «апоптоз» впервые был использован в 1972 г., и с этого времени интерес к процессу клеточной гибели неуклонно увеличивается, в первую очередь из-за того, что в ряде патологических состояний обнаружено его нарушение [Григорьев М. Ю., Имянитов Е. Н., Хансон К. П., 2003; Smith M. D., Walker J. G., 2004; Teodoro J. S. et al., 2011].

Морфологически апоптоз характеризуется уменьшением и фрагментацией ядра и цитоплазмы, распадом клетки на несколько апоптотических телец, которые содержат в своём составе фрагменты ядра и неактивные органеллы, которые становятся узнаваемыми для фагоцитов, в результате чего быстро поглощаются [Григорьев М. Ю., Имянитов Е. Н., Хансон К. П., 2003; Нагорнев В. А., Восканьянц А. Н., 2003; Рыжов С. В., Новиков В. В., 2007; Бессмельцев С. С. и др., 2011; Мнихович М. В., 2011; Smolewska E. et al., 2003]. Благодаря этому содержимое цитоплазмы не проникает во внеклеточную среду, что препятствует развитию воспаления [Владимирская Е. Б., 2002; Григорьев М. Ю., Имянитов Е. Н., Хансон К. П., 2003]. Именно благодаря отсутствию последнего процесс апоптоза, как правило, происходит без каких-либо макроскопических признаков [Григорьев М. Ю., Имянитов Е. Н., Хансон К. П., 2003].

Условно весь процесс апоптоза можно разделить на две фазы. Первая характеризуется формированием и проведением апоптотических сигналов в клетке, вторая – разрушением клеточных структур [Владимирская Е. Б., 2002; Нагорнев В. А., Восканьянц А. Н., 2003; Косенков Д. А., Зыкова Е. С., Обухов А. А., 2007]. Центральное место в формировании конечной цели апоптотического процесса занимают каспазы. Они представляют собой аспартат-специфические протеазы и состоят из трёх частей: большой и малой субъединиц,

а также N-концевого домена [Владимирская Е. Б., 2002; Мартынова Е. А., 2003; Нагорнев В. А., Восканьянц А. Н., 2003]. В жизнеспособной клетке каспазы сосредоточены в интактном состоянии в цитоплазме [Григорьев М. Ю., Имянитов Е. Н., Хансон К. П., 2003; Нагорнев В. А., Восканьянц А. Н., 2003]. Активация каспазы происходит путём отщепления N-концевого домена, соединения большой и малой субъединиц в один гетеродимер с последующим формированием активного центра [Владимирская Е. Б., 2002].

По своей структуре и функциональным возможностям каспазы подразделяются на три основных группы [Владимирская Е. Б., 2002; Григорьев М. Ю., Имянитов Е. Н., Хансон К. П., 2003]:

1) активаторы цитокинов (каспаза 1, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 13);

2) эффекторные каспазы (каспаза 3, каспаза 6, каспаза 7);

3) индукторы активации эффекторных каспаз (каспаза 2, каспаза 8, каспаза 9, каспаза 10).

Митохондриальный путь апоптоза инициируется в ответ на повреждение ДНК или воздействием агентов, приводящих к повреждению клетки. Важнейшим элементом протекания данного пути является ген, кодирующий образование белка p53 [Haupt S. et al., 2003; Itoh K. et al., 2004]. Образованный белок p53 находится в латентном состоянии и активируется в ответ на такие события, как повреждение ДНК, гипоксия, а также активация онкогенов [Владимирская Е. Б., 2002]. При этом его воздействие приводит к прекращению клеточного деления, активации образования свободных форм кислорода и ряду других биохимических процессов. Один из таких процессов характеризуется активацией соединений группы bcl-2, которая объединяет семейство белков, в которых находится BH (bcl-2 homology domain) – одна из четырёх аминокислотных последовательностей [Чурилова А. В., Глущенко Т. С., Самойлов М. О., 2014]. Группу белков bcl-2 можно разделить на две подгруппы – индукторы и ингибиторы апоптоза [Владимирская Е. Б., 2002; Kramer A. et al., 2008]. Именно на основании преобладания того или иного вида bcl-2 принимается решение об активации апоптоза [Kramer A. et al., 2008].

Характерной особенностью белков группы bcl-2 является наличие особого гидрофобного региона, способного прикрепляться к клеточным органеллам и вызывать временное открытие более крупных, в отличие от нормы, мембранных каналов, через которые в цитоплазму могут проникнуть цитохром С и другие факторы апоптоза [Владимирская Е. Б., 2002; Kramer A. et al., 2008]. Также к следствию чрезмерного открытия мембранных каналов можно отнести растяжение внутренней митохондриальной мембраны, по сравнению с наружной, что может привести к разрыву и высвобождению цитохрома С [Нагорнев В. А., Восканьянц А. Н., 2003].

Изучение механизмов формирования и особенностей протекания апоптотического процесса позволяет воздействовать на его отдельные этапы и проводить коррекцию [Стадников А. А. и др., 2007; van den Berg J. M. et al., 2001]. На основе этих знаний разработаны и уже используются целый ряд цитотоксических химиопрепаратов, позволяющих индуцировать апоптотический процесс в различных типах клеток. Например, при применении антагонистов эстрогеновых рецепторов отмечается регрессия рака молочной железы [Tegeder I., Pfeilschifter J., Geisslinger G., 2001; Smith M. D., Walker J. G., 2004]. В ближайшее время стоит ожидать появления новых лекарственных препаратов для профилактики и лечения различных заболеваний, механизмом действия которых является регуляция апоптотических процессов, в том числе с использованием наночастиц.

1.3. Арабиногалактан и поли-1-винил-1,2,4-триазол – перспективные полимерные матрицы для создания нанобиокомпозитов медицинского назначения

Природный полисахарид арабиногалактан представляет собой водорастворимый белый или кремовый порошок цвета без вкуса и запаха с запатентованной технологией производства [Способ получения арабиногалактана, 2005]. Макромолекула арабиногалактана (Рисунок 1.2) представлена остатками двух моносахаридов – галактозы и арабинозы. Согласно

патенту, в структуре полисахарида имеется главная цепь, состоящая из галактопиранозильных звеньев, соединённых β-связями (1 → 3), и боковая цепь, представляющая собой различные сочетания галактопиранозильных и арабинофуранозильных остатков, соединённых β-связями (1 → 6) [Нанокомпозит серебра на основе сульфатированного…, 2012].

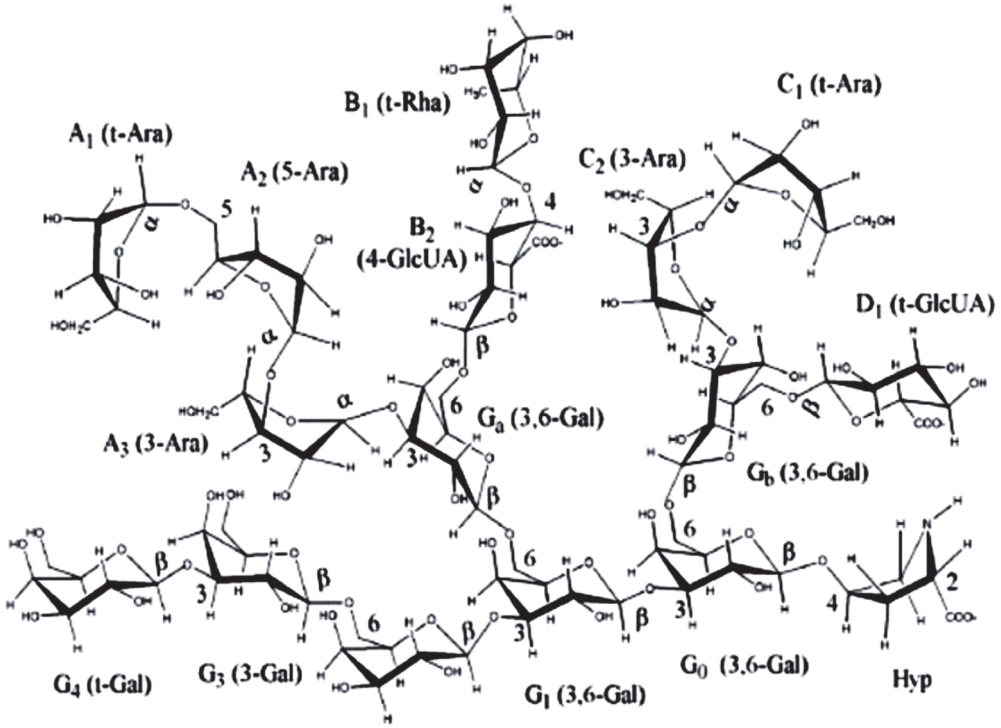

Рисунок 1.2 – Макромолекула арабиногалактана

Синтез полимера осуществляется из древесины лиственницы, где его содержание достигает 15 %. Указанный полимер является биологически активным веществом с широким спектром активности. Уже получены положительные результаты о гастропротекторных, иммуномодулирующих, мембранотропных и антиоксидантных свойствах полимера [Медведева Е. Н., Бабкин В. А., Остроухова Л. А., 2003; Потапов А. И. и др., 2013; Завезенова И. В., 2014; Medvedev S. A. et al., 2002, 2007]. Проведённое совместное исследование учёных из Иркутска и Владивостока показало, что арабиногалактан значительно ослабляет действие химических токсикантов на процессы окисления с участием свободных радикалов [Kolzunova L. G., Goldsmith R. N., Shaydurova E. S., 2008].

На основе искомого арабиногалактана, описанного выше, в лаборатории химии древесины Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского СО РАН был синтезирован нанобиокомпозит с добавлением оксида серебра (Ag_2O) (время протекания химической реакции 30–60 мин при температуре 20 °С) [Нанокомпозит серебра на основе сульфатированного…, 2012]. Схематичная структура синтезированного нанобиокомпозита представлена на рисунке 1.3.

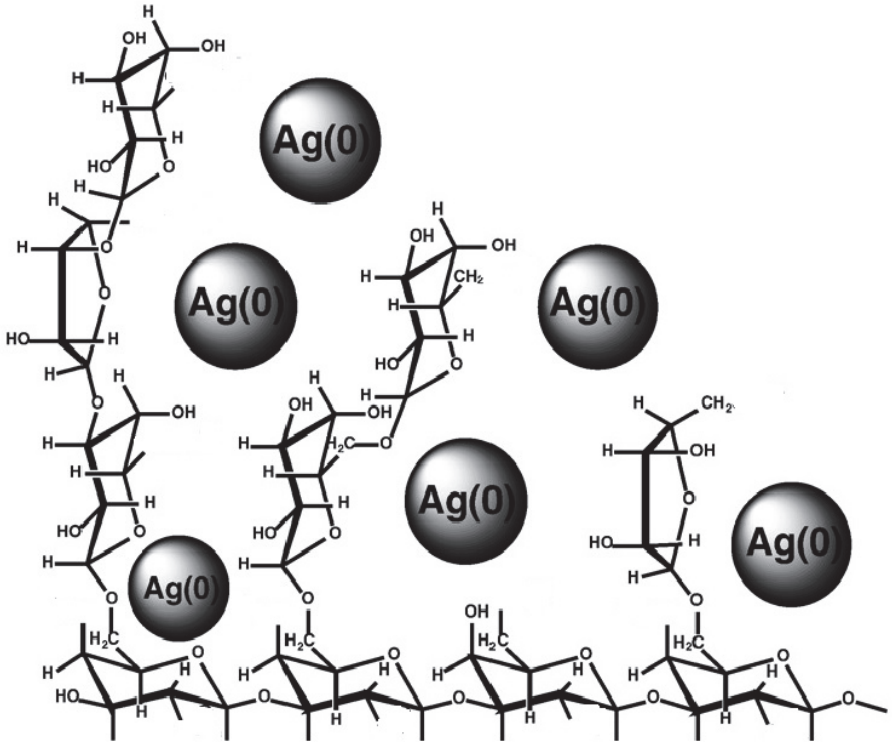

Рисунок 1.3 – Схематичная структура синтезированного нанобиокомпозита на матрице арабиногалактан [Shurygina I. A. et al., 2011]

При исследовании физико-химических характеристик полученного нанобиокомпозита было выявлено, что наночастицы серебра в структуре нанобиокомпозита имеют сферическую форму, пики серебра отчётливо фиксируются на дифрактограмме (Рисунок 1.4А), в структуре нанобиокомпозита преобладают наночастицы серебра диаметром от 4 до 8,9 нм (Рисунок 1.4Б).

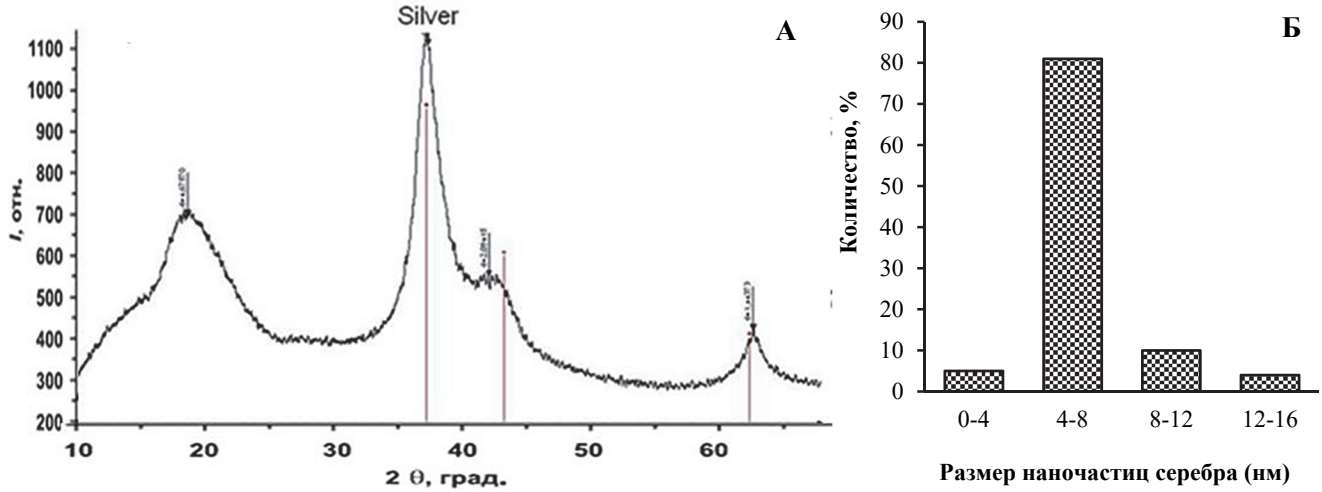

Рисунок 1.4 – Дифрактограмма образца нанобиокомпозита на матрице арабиногалактан (А); диаграмма распределения наночастиц серебра по размерам (Б)

В лаборатории синтетических и природных полимеров Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского СО РАН разработан нанокомпозит, состоящий из синтезированного в лабораторных условиях гетероциклического полимера ПВТ и наночастиц серебра, инкапсулированных в данную полимерную матрицу [Прозорова Г. Ф. и др., 2010].

ПВТ является водорастворимым биосовместимым (LD_{50} > 3000 мг/кг) полимером, обладающим химической стойкостью и термической стабильностью, способным стабилизировать частицы наночастицы серебра в нульвалентном состоянии (Рисунок 1.5) [Поздняков А. С., 2011; Поздняков А. С. и др., 2011].

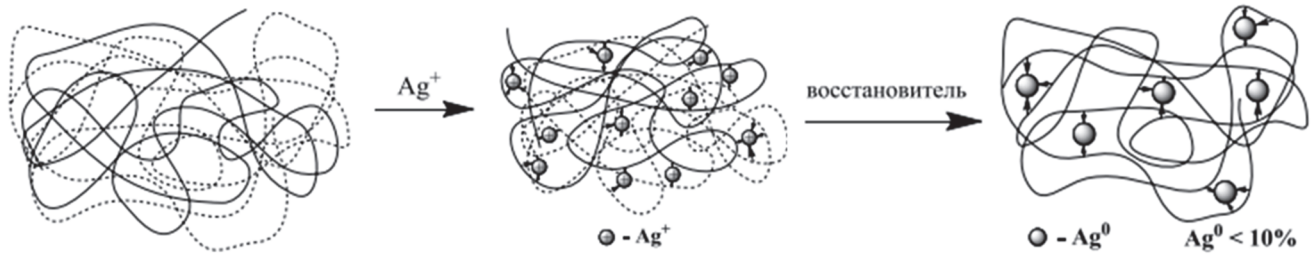

Рисунок 1.5 – Схема формирования нанобиокомпозита на матрице поли-1-винил-1,2,4-триазол

Полученный нанобиокомпозит, по результатам исследования физико-химических свойств, обладает равномерной структурой, наночастицы серебра в

его составе отчётливо различаются на дифрактограмме, имеют сферическую форму, в большинстве своём имеют размер 2–6 нм (Рисунок 1.6).

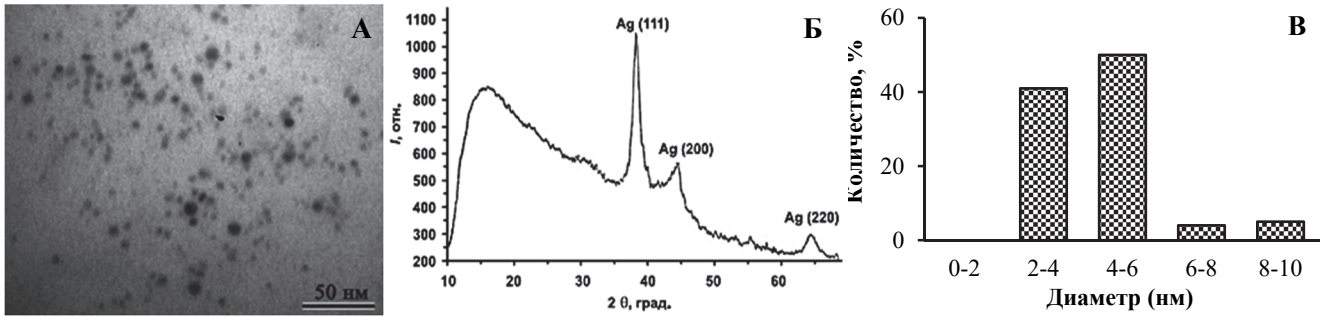

Рисунок 1.6 – Микрофотография нанокомпозита, состоящего из наночастиц серебра в матрице поли-1-винил-1,2,4-триазол (А) и его дифрактограмма (Б); диаграмма распределения наночастиц серебра по размерам (В)

1.4. Методические подходы к токсико-гигиенической оценке действия наночастиц на современном этапе

В Российской Федерации и многих зарубежных странах работы, связанные с синтезом и практическим применением наночастиц и наноматериалов, признаны одним из ключевых направлений инновационного развития. Ожидаемые экономические выгоды от использования наночастиц в различных отраслях промышленности, сельском хозяйстве и медицине превосходят все денежные вложения, направленные на их изготовление [Программа развития наноиндустрии в Российской Федерации…, 2008]. Однако постоянно нарастающий объём глобального производства наночастиц и наноматериалов существенно превосходит обоснование необходимых мер безопасности при работе с ними, что не может не вызывать озабоченности, поскольку объём ассигнований для определения их потенциальных угроз и оценки их токсичности невелик [Митрохин О. В., 2009; Сизова Е. А. и др., 2011].

В настоящее время немалая часть научных работ в области нанотехнологий посвящена установлению новых стандартов нанобезопасности и оценке биологических эффектов вновь синтезируемых наночастиц и наноматериалов. В основном это связано с тем, что одни и те же наночастицы и наноматериалы имеют несколько отличных друг от друга способов

производства, в зависимости от которых оказывают неодинаковое воздействие на окружающую среду и человека [Оксегендлер Г. И., 1982; О надзоре за продукцией, полученной…, 2007; Хотимченко С. А., Гмошинский И. В., Тутельян А. В., 2009; Канцельсон Б. А. и др., 2013]. Наночастицы разнообразны по химическому составу, размеру и форме, обладают различными поверхностными характеристиками, зарядом и т. д [Хотимченко С. А., Гмошинский И. В., Тутельян А. В., 2009; Онищенко Г. Г., 2010].

В РФ уже разработаны и приняты множество методических документов, касающихся наночастиц и наноматериалов, ведётся активная работа по совершенствованию нормативно-методической базы [Оценка безопасности наноматериалов *in vitro*…, 2009; Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности…, 2009; Использование методов количественного определения…, 2010; Методические указания по проведению…, 2010; Методы отбора проб, выявления…, 2010; Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка…, 2010; Онищенко Г. Г., 2010; Определение приоритетных видов наноматериалов…, 2010; Оценка безопасности контактирующих с пищевыми…, 2010; Контроль наноматериалов в объектах…, 2011; Контроль наноматериалов, применяемых в сельском…, 2011; Оценка воздействия наноматериалов на функцию…, 2011; Порядок и методы определения органотропности…, 2011; Порядок медико-биологической оценки…, 2011]. Так, в 2010 г. были предложены отечественные гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей и производственной среды (ГН 1.2.2633-10), к примеру, ориентировочно безопасные уровни воздействия в воздухе рабочей зоны таких наноматериалов, как диоксид титана, однослойные углеродные нанотрубки [Гигиенические нормативы содержания приоритетных…, 2010]. Также этот документ регламентирует ориентировочно допустимые уровни наносеребра в питьевой воде и в воде водоёмов. Данные нормативы утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 25.05.10 № 60 как временные, сроком на 3 года.

Из множества разработанных методических рекомендаций стоит выделить МР 1.2.0024-11 «Контроль наноматериалов, применяемых в химической промышленности», которые посвящены вопросам обеспечения единства измерений и методов контроля безопасности работников, занятых в сфере производства наночастиц и наноматериалов. Позиции документа распространяются на полный «цикл жизни» наночатиц и наноматериалов – от стадии разработки до стадии утилизации. В качестве основного инструмента предусматривается отбор проб в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе, воде, почве в районе размещения химического предприятия, а также технологический контроль наночастиц. Согласно рекомендациям, на устранение или ослабление эффектов действия наночастиц и наноматериалов и связанный с ними мониторинг условий труда должен быть направлен комплекс санитарно-гигиенических, медико-биологических и других мероприятий. Также методическими рекомендациями предусматривается применение эффективных средств коллективной и индивидуальной защиты на производстве, внедрение комплекса мер охраны окружающей среды и здоровья проживающего рядом с предприятием населения. В качестве инструментов для отбора проб и контроля наночастиц в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе в настоящее время используются сертифицированные пробоотборники (TEOM 1400; ОМПН-10.0; DustTrak 8530/8533), однако они имеют ограниченное применение в силу несовершенства системы фильтров, которые не способны улавливать мелкодисперсные частицы диаметром менее 100 нм.

Для производственного контроля самой высокотоксичной фракции наночастиц, аэрозолей предложен ряд приборов, в том числе анализатор наночастиц, действие которого основано на методе дифференциальной подвижности, позволяющий определить счётную, массовую и объёмную концентрации наночастиц [Потапов А. И. и др., 2013; PD 6699-2:2007, 2007]. Однако, как показывает практика, подобные высокотехнологичные устройства достаточно дорогие, что ограничивает их использование в силу экономических причин.

Также невозможно оставить без внимания серию нормативно-методических документов, которые посвящены вопросам оценки безопасности наночастиц и наноматериалов для здоровья человека и состояния окружающей среды [Методические рекомендации по выявлению…, 2009; Медико-биологическая оценка безопасности…, 2010; Контроль наноматериалов в объектах…, 2011]. В МУ 1.2.2875-11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в водоёмах» подробно расписан порядок отбора, транспортирования и хранения проб воды, донных отложений, водной растительности, содержащих наноматериалы. По мнению авторов, реализация данных методических указаний обеспечит безопасность стратегически важного хозяйственно-питьевого водоснабжения, а также поспособствует снижению риска или полному предотвращению загрязнения наночастицами водных объектов.

Нормативно-методические документы, выпущенные за рубежом, подразумевают использование роботов, замкнутые процессы и закрытое оборудование при обращении с наночастицами, обладающими высокой степенью токсичности. Также они регламентируют возможность замены конфигурации наночастиц для уменьшения их токсических свойств [Потапов А. И. и др., 2011; Technical Report ISO/TR 27628; Current Intelligence Bulletin 63, 2011]. Так же, как и в отечественных аналогах, в зарубежных рекомендациях прописано использование надёжных средств индивидуальной защиты (респираторы, защитные перчатки, очки и защитная одежда), Все рабочие должны проходить предварительные, периодические и углублённые медицинские осмотры и специализированное обучение [Худяков И. Ф., Дорошкевич А. П., Карелов С. В., 1987; PD 6699-2:2007, 2007]. Однако во многом международные рекомендации остаются позади отечественных аналогов. К примеру, иностранным аналогом «Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов» (2007) является издание «Nanomaterials and REACH» (2012). Оба издания посвящены одной и той же теме, а именно: они определяют государственную гигиеническую концепцию исследований, методологии и оценки риска наноматериалов, способов

их идентификации и количественного определения. Российское издание представляет вышеописанную концепцию на уровне Российской Федерации, иностранное издание – на уровне Европейского Союза. Сравнивая оба издания, можно найти совпадения. В частности, используется общая методология. Однако в данных методических документах имеются и существенные различия – сильно разнится объём необходимых токсикологических и медико-биологических исследований, которые необходимо провести, чтобы признать тот или иной наноматериал безопасным для окружающей среды и здоровья человека. В зарубежном документе для оценки используется лишь два параметра (объём годового производства, растворимость в воде и биологических жидкостях), тогда как отечественный документ, помимо вышеперечисленных, также включает в себя такие параметры, как физико-химические свойства (доказано, что токсичность наночастиц практически любой природы определяется формой, химической активностью и др.), установление шкалы приоритетов наночастиц для производства и потребления, а также более широкий набор тестов, при помощи которых можно более объективно оценить степень опасности наночастиц.

В целом, исследования, направленные на изучение эффектов действия наночастиц и наноматериалов на организм человека, являются важной токсико-гигиенической задачей, как и разработка и внедрение информативных и доступных средств контроля. Необходимо продолжать работу по обоснованию безопасных уровней в объектах окружающей и производственной среды, выработать единые критерии вредности наночастиц и наноматериалов. Решение всех этих проблем невозможно без широкого комплексирования и межведомственного сотрудничества. Пока перечисленные проблемы находятся в стадии решения, необходимо соблюдать максимальные меры защиты при работе с наночастицами, как с опасными химическими и биологическими веществами, и относиться к ним как к заведомо опасным [Хотимченко С. А., Гмошинский И. В., Тутельян А. В., 2009; Oberdörster G. et al., 2005].

Нормативно-методические акты в области изучения наночастиц и наноматериалов, принятые в настоящее время в Российской Федерации,

построены на принципах классической токсикологии, использование которых не всегда может выявить изменения в функциональном состоянии организма, являющиеся патогенетическим фактором в формировании соматической патологии. Коллегами из НИИ гигиены, профтатологии и экологии человека ФМБА России предлагается новый подход, включающий в себя как методы обнаружения и идентификации, так и изучение взаимодействия наночастиц с липидами, белками, нуклеиновыми кислотами, влияния на систему ПОЛ в экспериментах *in vitro* [Потапов А.И. и др., 2013]. В целом мы согласны с данной концепцией, поскольку она предусматривает и определение параметров токсичности, органотоксичности, изучение апоптоза и генотоксичности, изучение наночастиц в модельных системах. С этих позиций методические подходы, основанные на изменении клеточного и субклеточного метаболизма, позволят изучить особенности и закономерности формирования патологического процесса при воздействии наночастиц и материалов, прицельно выявлять точки их приложения и разработать критерии риска нарушений здоровья.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В медико-биологических исследованиях критерием, свидетельствующим о правомочности и надёжности условий моделирования, служит принцип подобия экспериментальной модели оригиналу. Согласно положению, предложенному Н. Н. Каркищенко (2004), основными её критериями являются:

– пространственное сходство или общность морфофункциональных характеристик органов и систем у прототипа человека и его биологической модели;

– единство или сходство метаболических, нейрорегуляторных, двигательных, эндокринных и экзокринных функций;

– единство или максимальное сходство эффектов критических систем и органов по их реагированию на выбранное исследуемое воздействие;

– сопоставимость констант или иных параметров, качественно оцениваемых и математически описываемых.

При оценке степени воздействия изучаемых нанобиокомпозитов использование в качестве тест-объектов грызунов, в частности белых крыс, считается достаточно обоснованным, поскольку молекулярная и клеточная биология их нервных клеток имеет высокую степень гомологии с другими высшими млекопитающими, в том числе и с человеком, а инбридинг мелких животных гарантирует относительную гомогенность особей [Каркищенко Н. Н, 2004]. Важными преимуществами грызунов являются их относительно низкая себестоимость и возможность проведения экспериментов на достаточно большом количестве животных, что значительно повышает воспроизводимость и статистическую значимость полученных результатов.

Для достижения цели и решения поставленных задач были проведены комплексные поэтапные исследования (Рисунок 2.1).

Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

2.1. Токсикологические методы

Включали воздействие нанобиокомпозитов на основе АГ и ПВТ в различных дозировках на белых крыс-самцов и мышей обоего пола, полученных путём собственного воспроизводства. Экспериментальные животные содержались в виварии ФГБНУ ВСИМЭИ на стандартном рационе вивария в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей. В экспериментах использовались 120 половозрелых белых беспородных крыс-самцов массой 180–260 г и 72 беспородных белых мыши массой 18–25 г. Группы животных подбирались в соответствии с методическими рекомендациями «Оценка безопасности наноматериалов», утверждёнными Приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 280 от 12.10.2007 г. Работа с лабораторными животными осуществлялась согласно протоколу исследований, в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных

целей (Страсбург, 1986), Женевской конвенцией о международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных (1985) и Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным (2000). Животные выводились из эксперимента методом декапитации в соответствии с «Правилами проведения работ с экспериментальными животными», утверждёнными Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. Животные распределялись по группам методом рандомизации. В качестве критериев приемлемости рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность по весу тела.

Для определения значения LD_{50} исследуемых нанобиокомпозитов белым мышам обоего пола внутрижелудочно атравматичным зондом вводили испытуемые дозы нанобиокомпозитов в диапазоне от 1500 до 5000 мг/кг, разведённых в 0,5 мл физиологического раствора. Животные группы контроля получали в эквивалентных дозах физиологический раствор. Длительность наблюдений за подопытыми белыми мышами составляла 14 дней.

Для изучения биологической ответной реакции организма белых крыс проводили подострый эксперимент с обследованием животных сразу после его окончания (ранний период обследования) и через 6 месяцев после окончания воздействия (отдалённый период обследования). Введение исследуемых нанобиокомпозитов осуществлялось перорально (с помощью зонда) в течение 9 дней. Особям, сформировавшим I группу (контроль), вводили по 0,5 мл дистиллированной воды. Животные II группы (КС) получали водную дисперсию коллоидного серебра (КС), стабилизированного казеином, с содержанием серебра 8 %. Животным III группы (АГ) вводили «чистый» АГ, без добавления наночастиц серебра, в дозе, эквивалентной введению нанокомпозита. Животным IV группы (нАГ100) вводили водный раствор нАГ из расчёта 100 мкг серебра на 1 кг массы в 0,5 мл дистиллированной воды. Животным V группы (нАГ500) вводили аналогичный водный раствор нАГ из расчёта 500 мкг серебра на 1 кг массы в 0,5 мл дистиллированной воды. Животные VI группы (ПВТ) получали в эквивалентных количествах раствор ПВТ (без наночастиц серебра). Животным VII группы (нПВТ100) вводили водный раствор аргентумполивинилтриазола из

расчёта 100 мкг серебра на 1 кг массы в 0,5 мл дистиллированной воды. Животные VI группы (нПВТ500) получали водный раствор аргентумполивинилтриазола из расчёта 500 мкг серебра на 1 кг массы в 0,5 мл дистиллированной воды.

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 малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК), в печени и крови – определение уровня восстановленного глутатиона. Кроме того, в этот же срок на атомно-абсорбционном спектрометре с пламенной и электротермической атомизацией на базе химико-аналитической производственной лаборатории Института геохимии им. А. П. Виноградова СО РАН (зав. лабораторией – к.ф.-м.н. В. И. Меньшиков) было выполнено исследование содержания серебра во внутренних органах животных (печени, почках, головном мозге). Для исследования был взято по 5 животных из каждой группы, всего было проведено 400 анализов.

2.2. Методы морфологических и морфометрических исследований

Для выполнения патоморфологических исследований после декапитации головной мозг от каждого исследуемого животного был извлечён [Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П., 1991] и фиксирован в нейтральном буферном растворе формалина (10 %), обезвожен этанолом восходящей концентрации (70 %, 80 %, 90 %, 95 % и 100 %) и помещён в гомогенизированную парафиновую среду для гистологических исследований HistoMix (BioVitrum, Россия). Подготовку нервной ткани для просвечивающей микроскопии осуществляли по методу А. А. Миронова (1994). Далее приготовленные с помощью микротома 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 крезиловым фиолетовым по методу Ниссля – для исследования структуры нейронов [Руководство по гистологии, 2001]. 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. Исследования выполняли совместно со старшим научным сотрудником лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ ВСИМЭИ к.б.н. Е. А. Титовым (зав. лабораторией – д.м.н., проф. Л. М. Соседова).

Окраска срезов гематоксилин-эозином: срезы депарафинизировали с помощью ксилола не менее 10 мин, затем проводили через восходящую концентрацию спиртов (70 %, 96 %). По окончании депарафинизации срезы хорошо промывали и опускали в дистиллированную воду на 5–10 мин. Затем на 3–5 мин (в зависимости от зрелости гематоксилина) наносили гематоксилин Бёмера. Образцы повторно промывали в водопроводной воде и на 10–15 с наносили солянокислый спирт. Для удаления излишков краски на 10 мин срезы опускали в водопроводную воду и затем на 30 с наносили эозин. Срезы вновь промывали в водопроводной воде и обрабатывали 96%-м спиртом. На заключительном этапе препараты опускали на 10–20 мин в карбол-ксилол и на 1 ч в орто-ксилол, после чего заключали в полистирол [Коржевский Д. Э., 2005].

Окраска крезиловым фиолетовым по методу Ниссля: препараты освобождали от парафина с помощью орто-ксилола и спиртов восходящей концентрации. Затем образцы окрашивали раствором крезилового фиолетового в течение 5 мин. Промывку осуществляли дистиллированной водой с последующей промывкой 96%-м спиртом, для удаления лишней краски. Затем срезы опускали в орто-ксилол и заключали в полистирол.

Морфометрический анализ ткани головного мозга включал в себя обзорную оценку состояния ткани, вычисление площади митохондрий в разные периоды обследования. Исследование препаратов проводили с помощью светооптического исследовательского микроскопа Olympus BX 51. Ввод микроизображений срезов мозга в компьютер проводили при помощи камеры Olympus E420. Обработка

полученных изображений осуществлялась с помощью методик, входящих в программный пакет Image Scope M. Для исследования был взят один образец от каждого животного во всех группах в раннем и отдалъенном периодах обследования и рассмотрен в 10 полях зрения. Общий объём исследования составил 240 образцов.

2.3. Методы иммуногистохимического анализа

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. Иммуногистохимические исследования проводили с помощью моноклональных антител (Lab Vision Corporation, США) и вторичных антител, конъюгированных с полимером и пероксидазой (Lab Vision Corporation, США). Визуализацию прореагировавших первичных антител производили при помощи хромогена DAB+ (Lab Vision Corporation, США). Выявление экспрессии осуществляли на парафиновых срезах. Для этого проводили депарафинизацию срезов по общепринятой методике: препараты опускали в ксилол на 10 мин, затем в 96%-й спирт на 5–6 мин, в 70–80%-й спирт на 2–3 мин, после чего промывали образец погружением в дистилированную воду на 10 мин. Затем для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывали 3%-й перекисью водорода в течение 5–10 мин. По окончании этой процедуры срезы помещали в фосфатно-солевой буфер (ФСБ; pH 7.5) на 5–10 мин, для блокирования неспецифического фонового окрашивания обрабатывали 5%-м бычьим сывороточным альбумином (BSA) в течение 10 мин. При последующем нанесении первичных моноклональных антител предметные стекла помещали во влажную камеру для предотвращения высыхания препаратов и, как следствие, развития неспецифической фоновой реакции, ставили в хладотермостат (4–60 °C) на 18 ч. После этого срезы помещали в ФСБ на 5 мин. Далее на образцы наносили вторичные антитела и оставляли при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего излишки антигена удаляли погружением срезов в ФСБ на 5 мин. На следующем этапе проводили обработку коньюгатом

стрептавидина и пероксидазой в течение 15 мин с последующей промывкой препаратов в ФСБ в течение 5 мин. Далее на срезы наносили хромоген DAB+ для визуализации окрашенного продукта, контролируя степень окраски под микроскопом. После достижения оптимального уровня окрашивания препараты промывали в дистиллированной воде в течение 10–15 мин, после чего проводили подкрашивание толуидиновым синим в течение 5 мин. После промывания дистиллированной водой в течение 1 мин срезы помещали в 96%-й спирт для дифференцировки окрашивания нейронов. На заключительном этапе препараты обезвоживали в абсолютном этаноле и в смеси этанола с орто-ксилолом 1 : 1 по 2–3 мин в каждом реагенте, просветляли в орто-ксилоле и заключали в полистирол. После высыхания полистирола полученные микропрепараты просматривали на светооптическом исследовательском микроскопе. Далее при помощи системы микроскопии и анализа Image Scope M были проанализированы заранее выбранные параметра анализа полученных фотоматериалов: общее количество нейронов на единицу площади, среди них – количество иммунопозитивных и иммунонегативных нормальных неизмененных нейронов и тёмных нейронов. Иммунопозитивными являлись окрашенные на антитела к белкам caspase-3 и bcl-2 клетки, а иммунонегативными – неокрашенные клетки, характеризующие, соответственно, нейроны с экспрессией и без экспрессии изучаемых белков. Тёмными считали уменьшенные в объёме, как правило, палочковидной формы, резко окрашенные клетки без чётко выделенного ядра [Гайкова О. Н., 2015]. Количество клеток определяли на единицу площади гистологического препарата (0,2 мм^2). Для исследования был взят один образец от каждого животного во всех группах в раннем и отдалённом периодах обследования и рассмотрен в 15 полях зрения. Общий объём исследования экспрессии белка bcl-2 составил 360 шт., caspase-3 – 360 шт.

2.4. Изучение состояния клеточных структур методом электронной микроскопии

Электронную микроскопию использовали для ультраструктурной оценки состояния нейронов коры головного мозга. Исследования выполняли в Центре

коллективного пользования «Электронная микроскопия» на базе Лимнологического института СО РАН (зав. центром – д.б.н., профессор Е. В. Лихошвай) на электронном микроскопе Leo 906E (Zeiss, Германия). В процессе микроскопии измеряли количество и площадь сечения митохондрий и ядер нейронов в разные периоды обследования, а также интенсивность демиелинизации отростков нейронов. Для проведения электронной микроскопии вырезали кусочки ткани из сенсомоторной коры, мозжечка и среднего мозга размером 1 × 1 мм. Материал выделяли и фиксировали в течение 1 ч в растворе, состоящем из 8 мл формальдегида, 4 мл глютаральдегида, 16 мл 1 М фосфатного буфера, 12 мл воды. Далее материал на протяжении 24 ч охлаждали в холодильнике в 0,1 М фосфатном буфере, после чего на 1,5 ч помещали в смесь из 2%-го OsO_4 и H_2O в соотношении 1 : 1. По завершении процесса осмирования кусочки ткани промывали при 50 °С и помещали в уранилацетат, приготовленный на 70%-м этаноле и определяли в тёмное место. Далее кусочки промывали в 70%-м спирте и проводили через восходящую концентрацию спиртов (80 %, 90 %, 96 % (1), 96 % (2), 100 %, 100 % + эфир) и эфиры (эфир (1), эфир (2), эфир (3)) – 15 мин. После обезвоживания образцы ткани заливали в смолы – эпон + аралдит (эпон 812 – 5 мл, DDSA – 11 мл, Аралдит М (мягкий) – 3 мл, дибутилфталат – 0,2–0,6 мл, ДМП 30 – 17 капель). Пропитка образцов смолой производилась в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем смешивали 2 части смолы и 1 часть эфира, образцы помещали в смесь на ночь при комнатной температуре. Далее срезы переносили в чистую смолу на сутки.

При окраске проводилось контрастирование уранилацетатом. Для контрастирования препаратов на парафин капали уранилацетат, разведённый в воде (насыщенный раствор). Сверху на каждую каплю добавляли 96%-й спирт в соотношении 1 : 1. Затем в капли препаратом вниз клали сеточки, накрывали крышкой и ставили в тёмное место. Далее каждую сеточку макали по 10 раз в 3 ёмкости с дистиллированной водой. В чашку с парафином выкладывали по краю сухую щёлочь, в центр капали ацетат свинца, помещали сетки и ставили в темноту (работа проводилась в маске, чтобы избежать попадания на препараты

CO_2). Уранилацетат прикапывали через воронку из фильтровальной бумаги. При иссечении интересующих нас кусочков тканей мозга сверялись с топографическим атласом головного мозга белых крыс. Для исследования был взят один образец от каждого животного во всех группах в раннем и отдалённом периодах обследования и рассмотрен в 10 полях зрения. Общий объём исследования составил 240 шт.

Для определения наночастиц серебра в тканях головного мозга использовался просвечивающий микроскоп Technai 2G (FEI, США) с полевым эмиттером и энергодисперсным детектором для элементного анализа в Центре коллективного пользования «Байкальский центр нанотехнологий» ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет» (зав. центром – д.ф.-м.н. А. Д. Афанасьев). Данный микроскоп позволяет как определять элементный состав в точке с определёнными координатами, так и производить «картирование» определённой части среза с выводом на экран всех химических элементов, обнаруженных в составе объекта. В гомогенатах внутренних органов наночастицы серебра определяли при помощи атомно-абсорбционного метода анализа с плазменной и электротермической атомизацией. Для исследования был взят один образец от каждого животного во всех группах в раннем и отдалённом периодах обследования и рассмотрен в 10 полях зрения. Общий объём исследования составил 240 шт.

2.5. Методы статистического анализа

Статистическую обработку результатов и многофакторный дискриминантный анализ проводили с помощью пакета программ Statistica 6.1 for Windows (лиц. № AXXR004E642326FA) [Реброва О. Ю., 2002]. Проверку значимости различий выборок изучаемых показателей контрольных и экспериментальных животных проводили при помощи непараметрического критерия Манна – Уитни, так как сравниваемые выборки не удовлетворяли условиям нормальности распределения. 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 приоритетным направлением развития науки, технологий и техники в РФ «Индустрия наносистем» и критической технологией 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 26.10.2011 г.

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕР НАРУШЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ АРГЕНТУМАРАБИНОГАЛАКТАНА

3.1. Определение среднесмертельной дозы аргентумарабиногалактана

При проведении острого опыта на теплокровных животных с целью установления параметров токсичности чаще всего учитываются три критерия: максимально переносимая доза; среднесмертельная доза, вызывающая смерть 50 % подопытных особей; абсолютно смертельная доза, воздействие которой влечёт за собой гибель всех животных. Наибольшее значение для характеристики вещества имеет среднесмертельная доза, так как анализ «кривой нормального распределения» показывает, что гибель животных от дозы, находящейся в области LD_{50}, наиболее вероятна. Среднесмертельная доза позволяет путём сопоставления получить представление и о сравнительной токсичности изучаемого вещества.

При внутрижелудочном введении белым мышам обоего пола изучаемого препарата в дозах 1500, 3000 и 5000 мг/кг массы тела гибели животных на протяжении 14 дней не отмечено. Каких-либо отклонений в поведении, внешнем виде животных, потреблении корма и воды не наблюдалось. На протяжении всего периода обследования общее состояние, шерстяной покров и поведение животных как самцов, так и самок всех экспериментальных групп соответствовало обычному. Различий в массе между опытными и контрольными животными не наблюдалось. Половых различий в чувствительности к исследуемым субстанциям при данном способе введения не выявлено.

При вскрытии опытных и контрольных мышей обоего пола, умерщвлённых в конце эксперимента (через 14 дней), различий при макроскопическом обследовании между ними не установлено. Внутренние органы были без изменений, кровоизлияний не наблюдалось.

Таким образом, нанобиокомпозит отнесён по параметрам токсикометрии к IV малоопасному классу веществ, имеющему LD_{50} при внутрижелудочном введении более 5000 мг/кг

3.2. Исследование биохимических показателей при введении аргентумарабиногалактана

Решение провести изучение интегральных и биохимических показателей организма белых крыс связано с тем, что, согласно методическим рекомендациям, данные методы до сих пор являются инструментарием, который способен качественно и объективно оценить степень воздействия частиц в наноформе на живой организм. Нами были исследованы показатели общей массы тела, печени, почек и селезёнки животных до и после введения изучаемого нанобиокомпозита в раннем периоде обследования; некоторые биохимические показатели: индикаторы антиоксидантной системы (АОС): активность ферментов каталазы и пероксидазы, уровень SH-глутатиона, и системы перекисного окисления липидов (ПОЛ): уровни МДА и ДК (Таблица 3.1).

По результатам исследования выявлено, что введение препарата, содержащего наночастицы металлического серебра, вызывало статистически значимое увеличение активности каталазы и повышение уровня восстановленного глутатиона в крови, по сравнению с группой контроля, что может косвенно свидетельствовать об активации естественной антиоксидантной защиты в ответ на введение в организм чужеродного агента. Одновременно с этим нАГ и чистый АГ вызывали повышение в крови активности пероксидазы, носящее характер тенденции. Показатели, характеризующие активность системы ПОЛ, при введении нанобиокомпозита не отличались от аналогичных результатов группы контроля и групп сравнения. У белых крыс, получавших нАГ, наблюдалось возрастание абсолютной массы селезёнки, что косвенно может свидетельствовать об иммуномодулирующем эффекте препарата, в то время как при изолированном введение арабиногалактана масса селезёнки не отличалась от таковой у животных группы контроля.

Таблица 3.1 – Биохимические и интегральные показатели белых крыс через 9 суток после внутрижелудочного введения АГ, КС и нАГ100 (M ± m)

Изучаемые показатели	Контроль	КС	АГ	нАГ100
Масса тела до опыта, г	193,3 ± 20,9	213,3 ± 22,2	207,5 ± 24,8	213,3 ± 23,8
Масса тела после опыта, г	247,5 ± 29,4	260 ± 19,23	263,3 ± 30,2	260,8 ± 22,2
SH-глутатион в печени, мкмоль/мл	4,14 ± 0,62	4,02 ± 1,53	4,54 ± 0,58	4,53 ± 0,71
SH-глутатион в крови, мкмоль/мл	0,94 ± 0,06	1,01 ± 0,05	0,86 ± 0,10$^{\#}$	1,17 ± 0,18*
Активность каталазы, Е/мл мин	4,19 ± 1,31	6.86 ± 2,54*	7,54 ± 3,26*	8,39 ± 4,13*
Пероксидаза, мкмоль/мл мин	215,5 ± 61,7	250,2 ± 31,4	235,4 ± 35,5	265,7 ± 38,6
МДА, мкмоль/л	1,39 ± 0,3	1,37 ± 0,32	1,37 ± 0,29	1,35 ± 0,29
ДК, усл. ед./мл	0,67 ± 0,12	0,68 ± 0,15	0,65 ± 0,11	1,63 ± 0,33
Масса печени, г	7,93 ± 1,25	7,77 ± 0,92	7,95 ± 0,6	7,84 ± 0,69
Масса левой почки, г	0,87 ± 0,12	0,88 ± 0,15	0,85 ± 0,11	1,03 ± 0,09*
Масса правой почки, г	0,96 ± 0,07	0,90 ± 0,18	0.89 ± 0,14	1,05 ± 0,07
Масса селезёнки, г	0,67 ± 0,07	0,58 ± 0,1*	0,71 ± 0,13	0,77 ± 0,07*

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0,05$ * – по сравнению с группой контроля, $^{\#}$ – по сравнению с группой нАГ

В целом исследование нАГ на уровне органов и системы органов не выявило каких-либо серьёзных нарушений: напротив, наблюдалась активация естественной антиоксидантной защиты.

3.3. Определение концентрации серебра во внутренних органах при введении аргентумарабиногалактана

В целях определения содержания серебра во внутренних органах лабораторных животных, подверженных воздействию «чистого» АГ и нанобиокомпозита на его основе в дозе 100 мкг/кг, были проведены измерения на атомно-абсорбционном спектрометре с пламенной и электротермической атомизацией. При введении нАГ100 выявлено накопление наносеребра в ткани печени, почек и головного мозга

подопытных животных с проявлениями органной специфичности и количественными различиями в содержании металла. При воздействии композита нАГ наносеребро преимущественно поглощается гепатоцитами, накапливаясь в ткани печени – 0,24 ± 0,02 мг/кг (Таблица 3.2). Аналогичная закономерность наблюдалась и при введении эквивалентной дозы коллоидного серебра (0,33 ± 0,06 мг/кг). Количество серебра при введении нАГ, определяемого данным методом, в почках и головном мозге было практически на одном уровне.

Таблица 3.2 – Результаты определения концентрации серебра во внутренних органах в группах контроля, КС, АГ, нАГ100, мг/кг (M ± m)

Наименование группы	**Мозг**	**Печень**	**Почки**
Контроль	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
АГ	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
нАГ100	0,11 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,14 ± 0,02
КС	0,07 ± 0,01	0,33 ± 0,06	0,13 ± 0,02

Обращает на себя внимание тот факт, что незначительное количество серебра было обнаружено в головном мозге, печени и почках животных, вообще не подверженных воздействию нанобиокомпозита (группа АГ и контроля). Известно, что серебро содержится в микроколичествах в организме человека и животных. Однако полученные результаты значений уровня серебра в органах животных групп сравнения (группы АГ и контроля) на порядок превышают физиологические нормы серебра в тканях организма [Скальный А. В., 2004]. По нашему мнению, это связано с низкой разрешающей способностью прибора, который был использован для проведения исследования ультрамалых концентраций вещества и рекомендован в методических рекомендациях.

3.4. Морфологическое и морфометрическое исследование коры головного мозга при воздействии аргентумарабиногалактана

При исследовании морфологической структуры головного мозга животных, подверженных воздействию «чистого» АГ, в раннем периоде обследования

отмечалось расширение периваскулярных пространств в зоне коры, наличие тёмных нейронов, а также нейронофагия (Рисунок 3.1, 3.2). Расширение периваскулярных пространств и нейронофагия также отмечались в отдалённом периоде обследования (Рисунок 3.3, 3.4, 3.5).

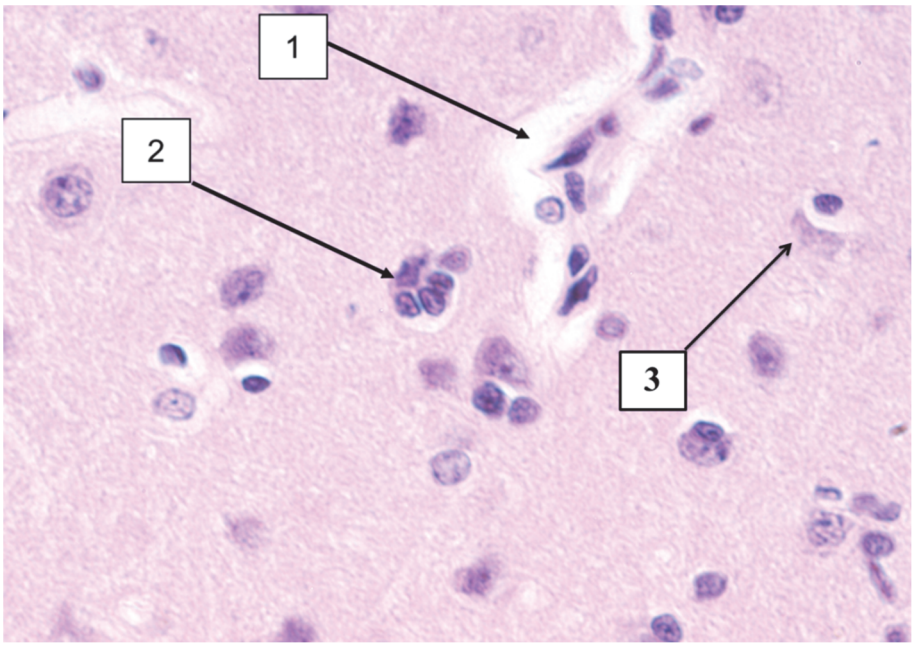

Рисунок 3.1 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы АГ (ранний период обследования):
1 – расширение периваскулярных пространств; 2 – нейронофагия; 3 – тёмный нейрон. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

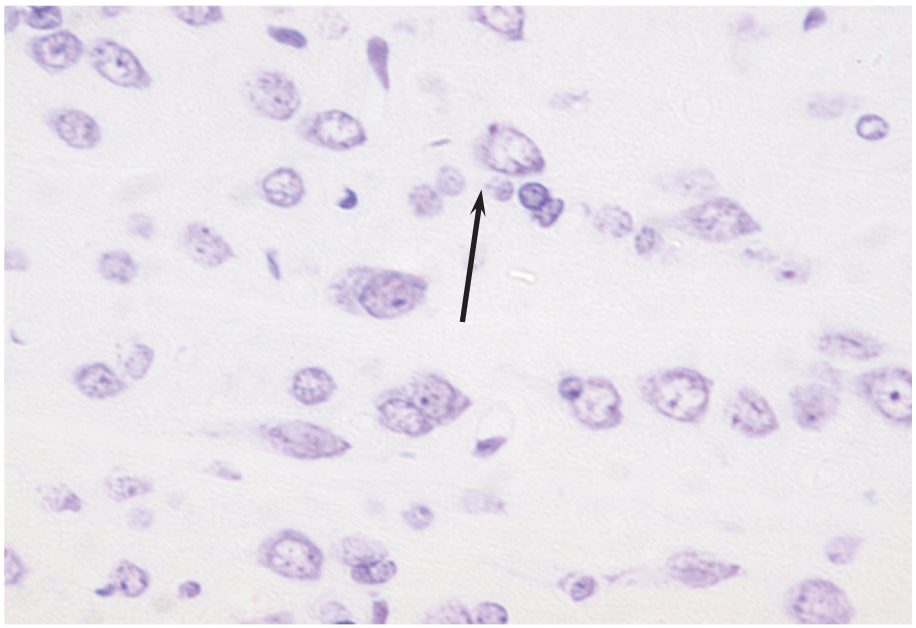

Рисунок 3.2 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы АГ (ранний период обследования). Нейронофагия (стрелка). Окраска крезиловым фиолетовым по Нисслю. Ув. ×400

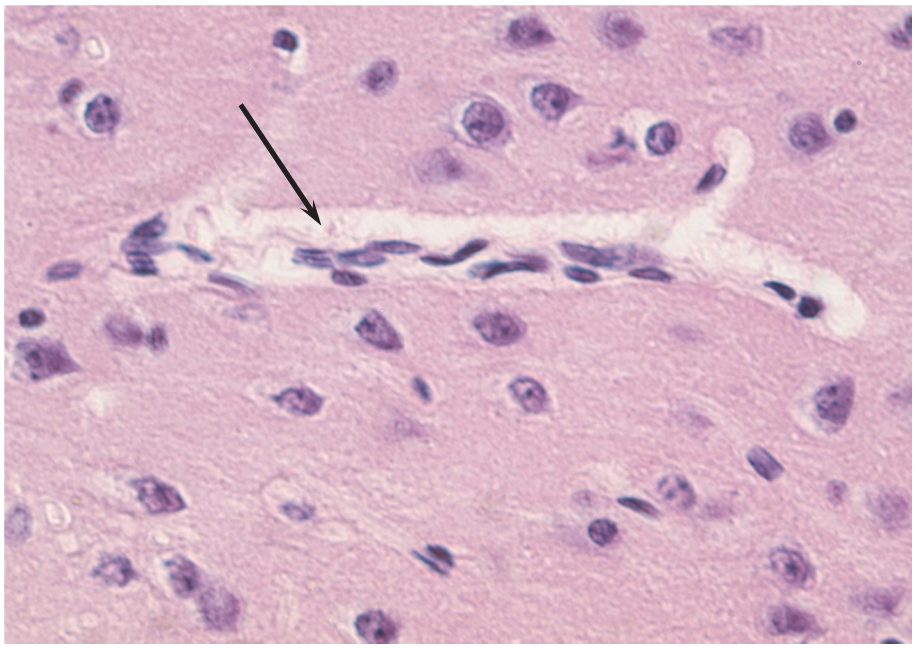

Рисунок 3.3 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы АГ (отдалённый период обследования). Расширение периваскулярных пространств (стрелка). Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

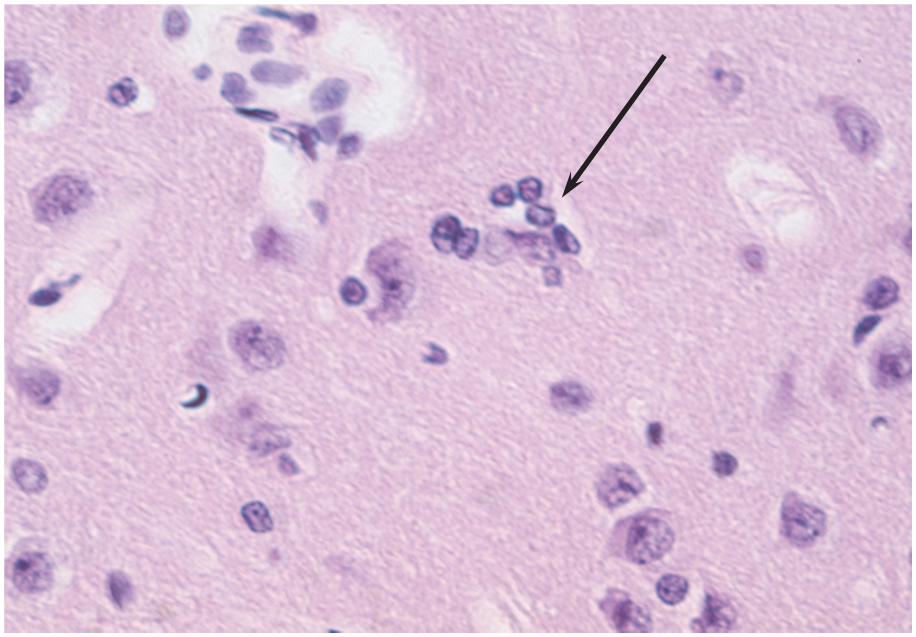

Рисунок 3.4 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы АГ (отдалённый период обследования). Нейронофагия (стрелка). Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

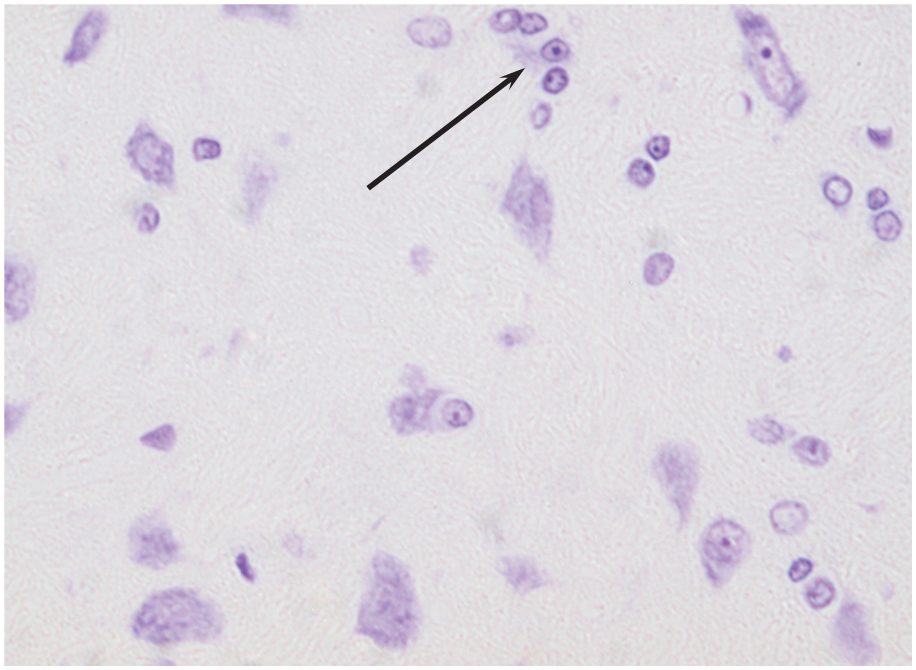

Рисунок 3.5 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы АГ (отдалённый период обследования). Нейронофагия (стрелка). Окраска крезиловым фиолетовым по Нисслю. Ув. ×400

При воздействии нАГ100 в раннем периоде обследования отмечено незначительное набухание проводящих волокон, в также более выраженное, по сравнению с группой АГ, расширение периваскулярных пространств (Рисунок 3.6), наличие тёмных нейронов (Рисунок 3.7), нейронофагия (Рисунок 3.8).

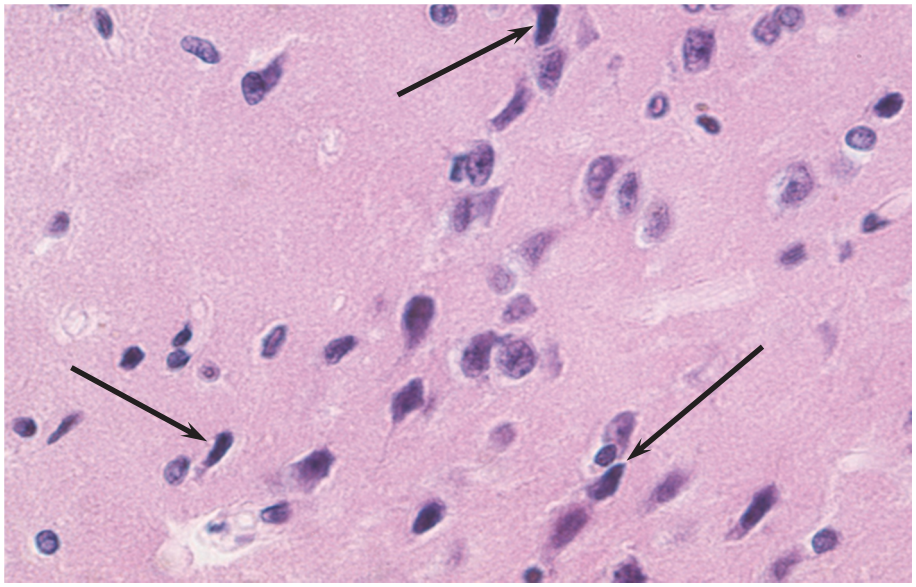

Рисунок 3.6 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ100 (ранний период обследования). Тёмные нейроны (стрелки). Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

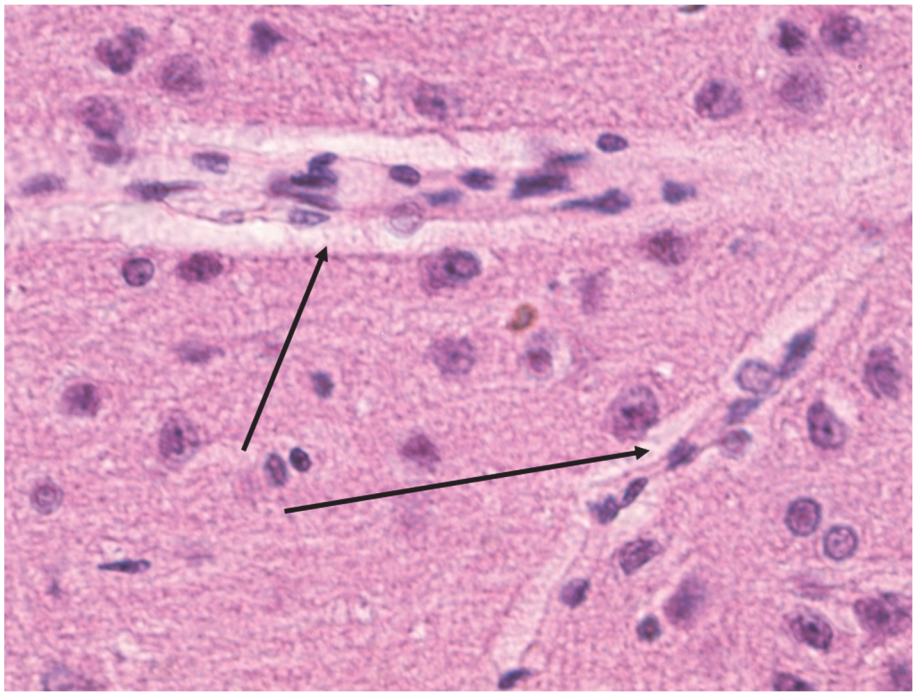

Рисунок 3.7 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ100 (ранний период обследования). Расширение периваскулярных пространств (стрелка). Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

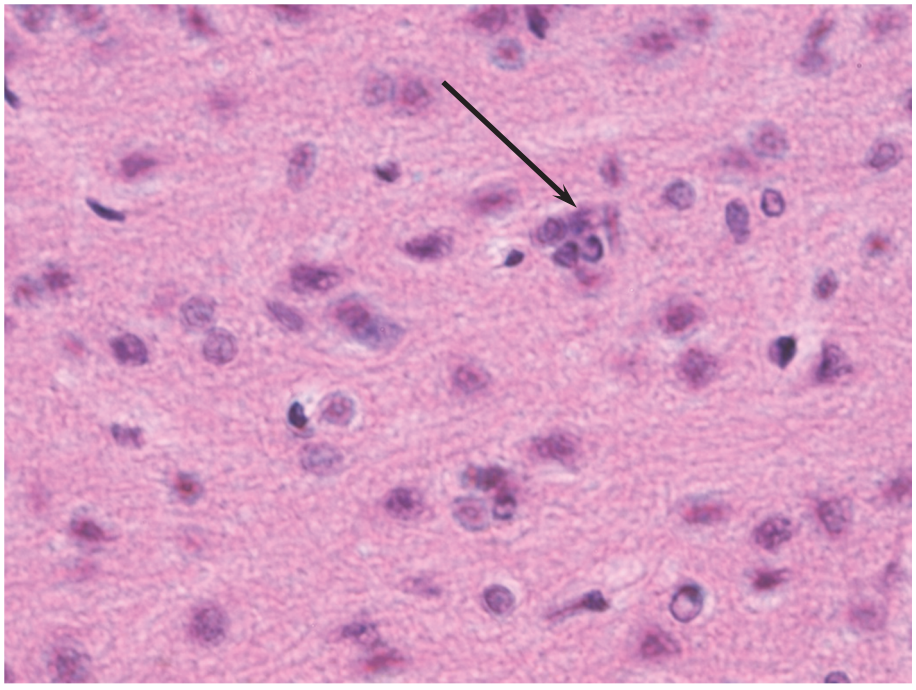

Рисунок 3.8 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ100 (ранний период обследования). Нейронофагия (стрелка). Окраска крезиловым фиолетовым по Нисслю. Ув. ×400

В отдалённом периоде при воздействии нАГ100 наблюдалось наличие тёмных нейронов (Рисунок 3.9), очаговое разрыхление проводящих пучков (Рисунок 3.10), расширение периваскулярных пространств (Рисунок 3.11) нейронофагия (Рисунок 3.12).

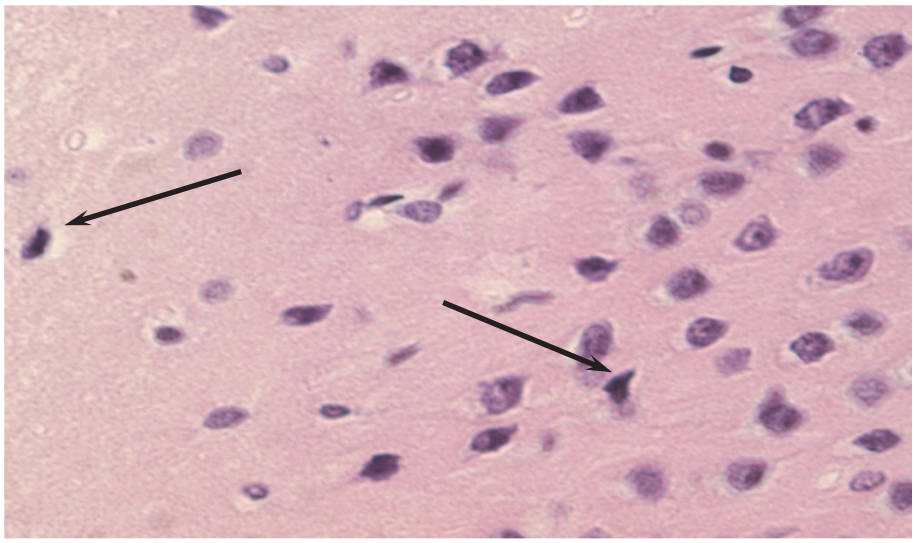

Рисунок 3.9 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ100 (отдалённый период обследования). Тёмные нейроны (стрелка). Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

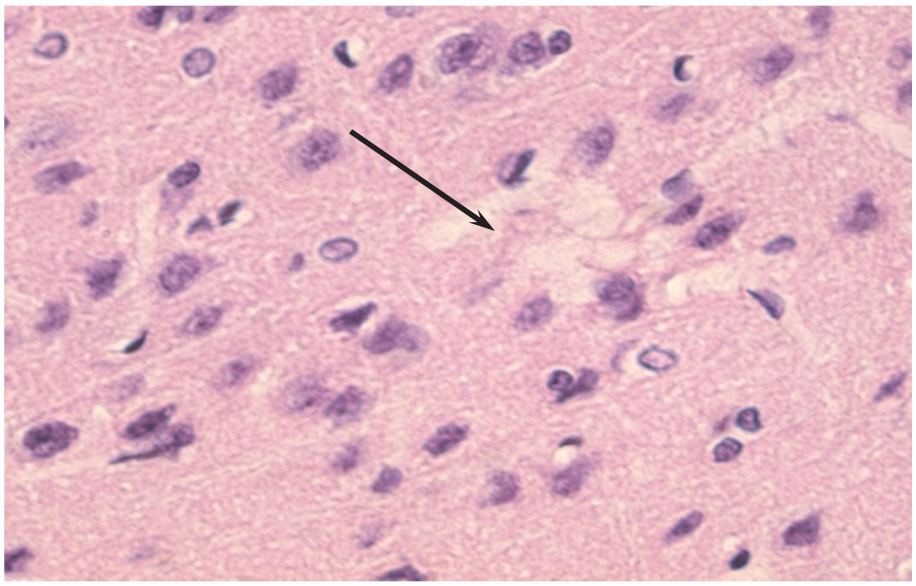

Рисунок 3.10 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ100 (отдалённый период обследования). Очаговое разрыхление проводящих пучков (стрелка). Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

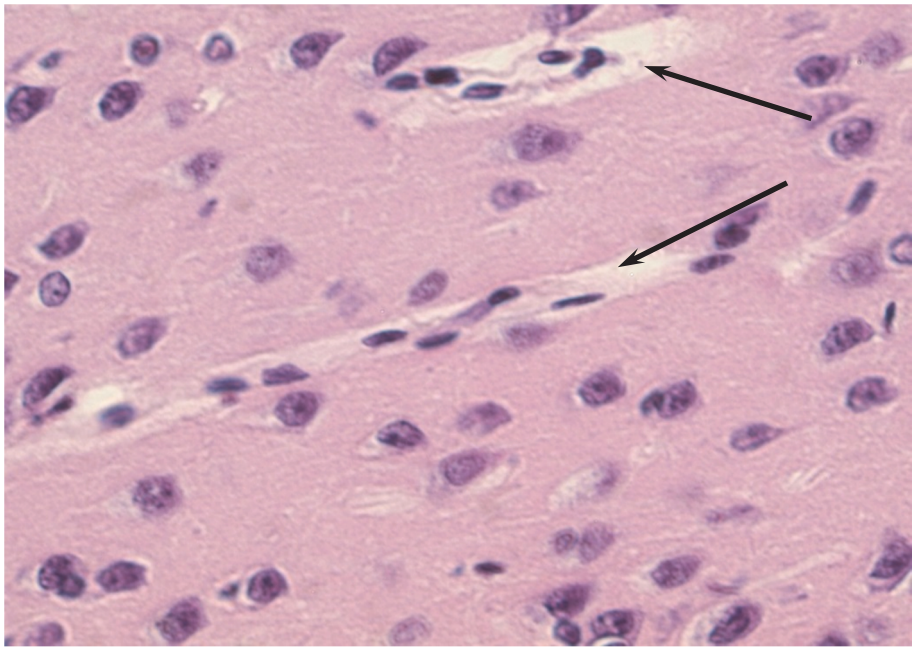

Рисунок 3.11 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ100 (отдалённый период обследования). Расширение периваскулярных пространств. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

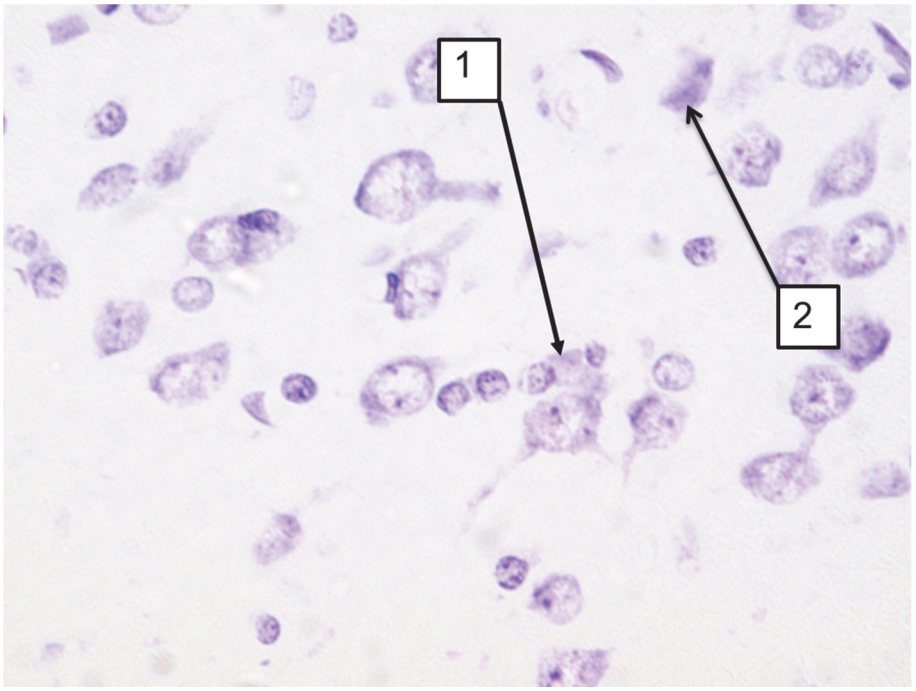

Рисунок 3.12 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ100 (отдалённый период обследования): 1 – нейронофагия; 2 – тёмный нейрон. Окраска крезиловым фиолетовым по Нисслю. Ув. ×400

При исследовании срезов головного мозга животных группы нАГ500 в раннем периоде выявлено расширение периваскулярных пространств, а также

набухание миоцитов и эндотелиоцитов сосуда, стенки артерий при этом были утолщены (Рисунок 3.13). Также наблюдались нейронофагия и наличие тёмных нейронов (Рисунок 3.14).

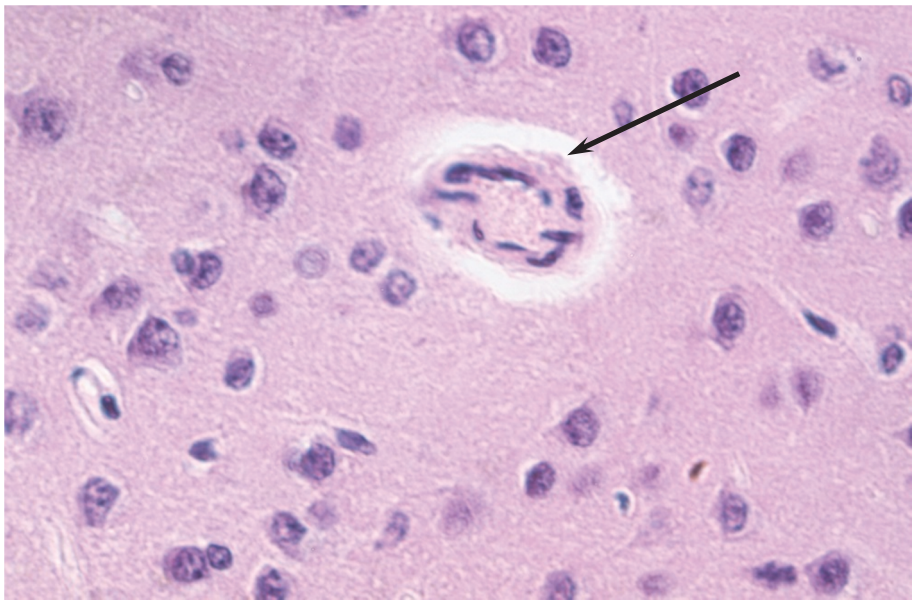

Рисунок 3.13 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ500 (ранний период обследования). Расширение периваскулярных пространств, стенка артерии утолщена, рыхлая, миоциты и эндотелиоциты набухшие (стрелка) Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

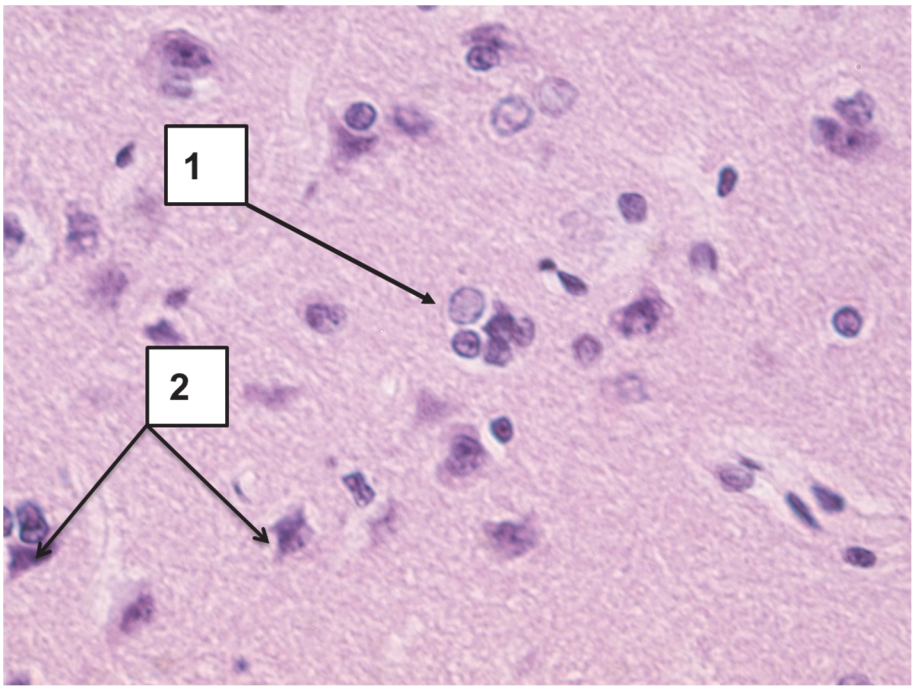

Рисунок 3.14 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ500 (ранний период обследования): 1 – нейронофагия; 2 – тёмные нейроны. Окраска гематоксилин-эозином Ув. ×400

В отдалённом периоде обследования сохранялось расширение периваскулярных пространств, при этом стенка артерии также была утолщённой, рыхлой, миоциты и эндотелиоциты – набухшими, наблюдалась нейронофагия (Рисунок 3.15).

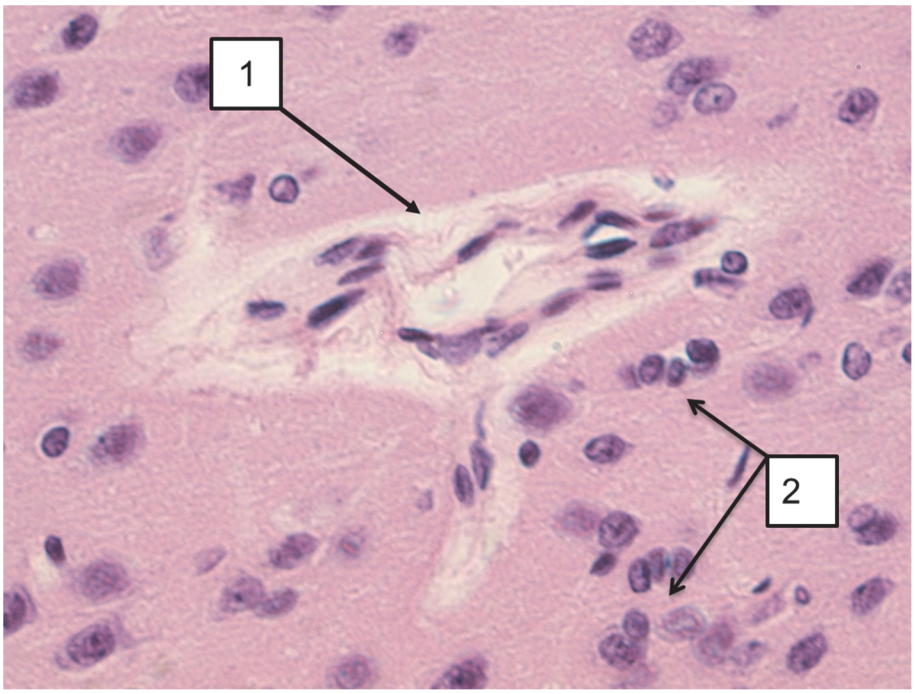

Рисунок 3.15 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нАГ500 (отдалённый период обследования): 1 – расширение периваскулярных пространств, стенка артерии утолщена, рыхлая, миоциты и эндотелиоциты набухшие; 2 – нейронофагия. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

Аналогичные изменения в нервной ткани описаны в исследованиях Abdelhalim M.A.K, Jarrar B.M. (2012) при введении крысам наночастиц золота в сопоставимых дозах [Abdelhalim M. A. K., Jarrar B. M., 2012].

В группе КС не наблюдалось никаких выраженных изменений в структуре нервной ткани как в раннем (Рисунок 3.16), так и в отдалённом периоде обследования (Рисунок 3.17).

На рисунках 3.18 и 3.19 представлены примеры электронограммы препаратов различных групп, на основании которых происходило вычисление площади митохондрий.

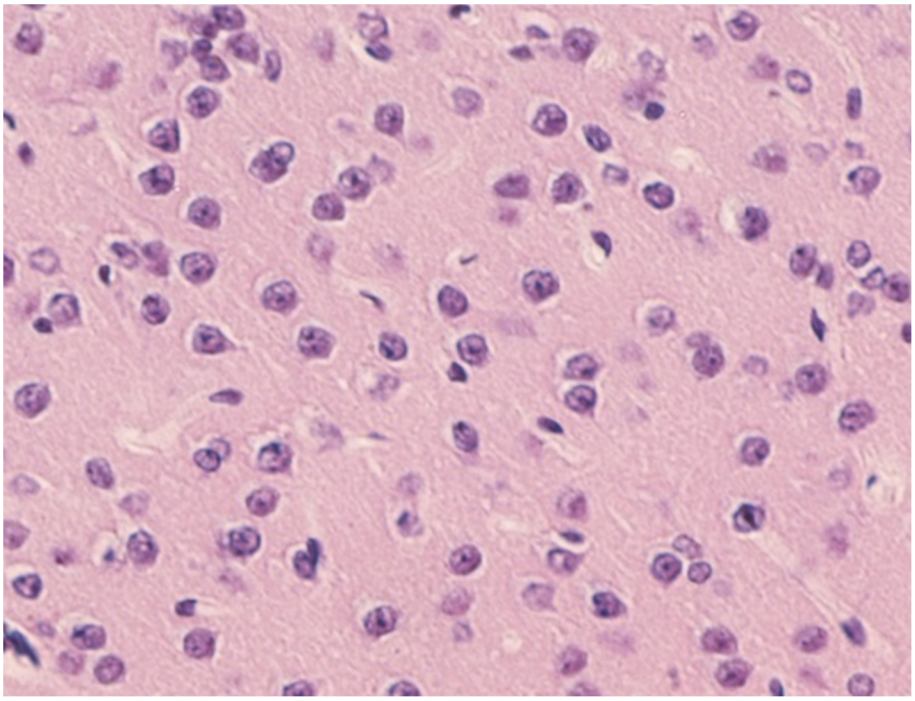

Рисунок 3.16 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы КС (ранний период обследования). Все структуры ткани в норме. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

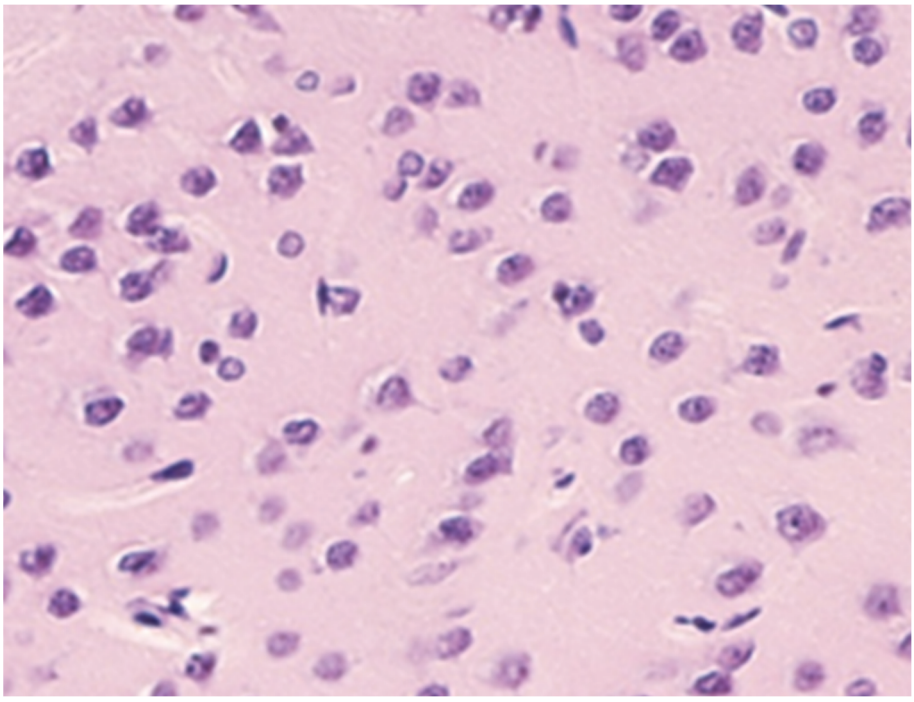

Рисунок 3.17 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы КС (отдалённый период обследования). Все структуры ткани в норме. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

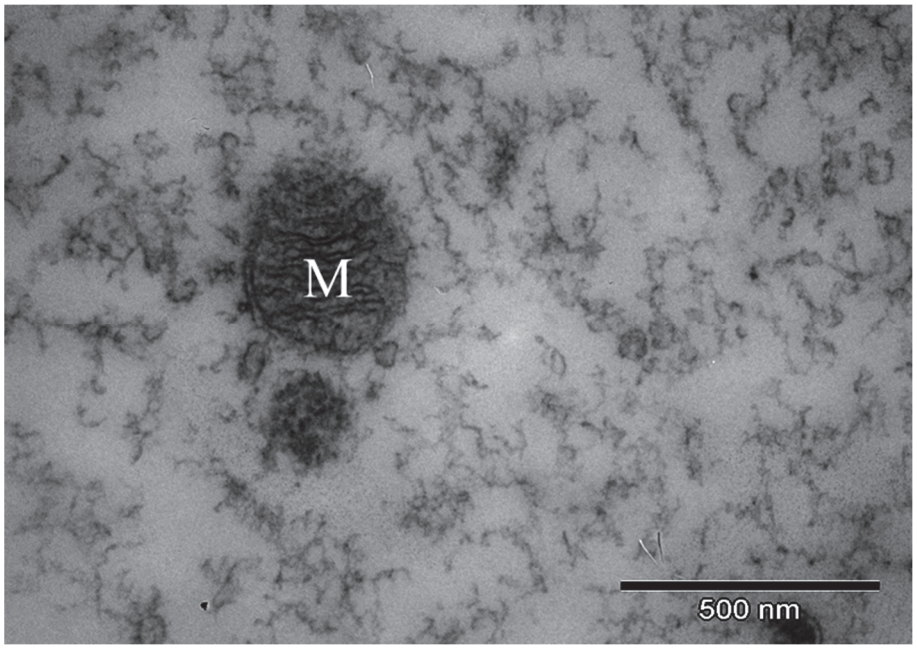

Рисунок 3.18 – Электронограмма препарата животного группы АГ (ранний период обследования). Митохондрии (М) использовались для вычисления площади митохондрий в группе. Ув. ×24000

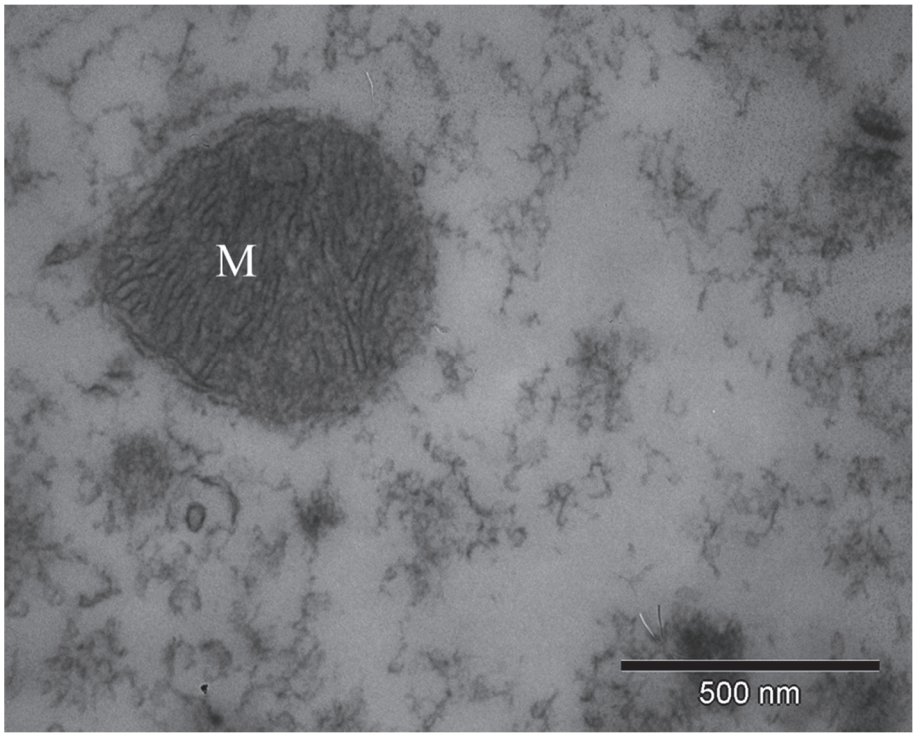

Рисунок 3.19 – Электронограмма препарата животного группы нАГ100 (отдалённый период обследования). Митохондрии (М) использовались для вычисления площади митохондрий в группе. Ув. ×24000

Результаты измерения площади митохондрий в нервных клетках особей групп контроля, АГ и нанокомпозитов на его основе представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Результаты измерения площади митохондрий (мкм^2) в нейронах животных групп контроля, КС, АГ, нАГ100 и нАГ500 в раннем и отдалённом периодах обследования

Группы	Ранний период	Отдалённый период
Контроль	0,75 (0,52–1,00)	0,76 (0,59–1,02)
КС	0,79 (0,65–1,14)	0,75 (0,59–0,98)
АГ	0,74 (0,52–0,95)	0,76 (0,50–0,89)
нАГ100	1,30 (0,71–2,25)*; #	1,74 (1,30–2,30)*; #
нАГ500	1,60 (0,60–2,00)*; #	2,20 (0,80–2,60)*; #

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

Из таблицы 3.3 следует, что при воздействии как нАГ100, так и нАГ500 наблюдалось статистически значимое увеличение площади митохондрий, сохраняющееся в течение длительного периода обследования. При этом через 6 мес. обследования площадь митохондрий увеличивалась, по сравнению с ранним периодом обследования. Значения КС не отличались от значений группы контроля.

3.5. Ультраструктурный анализ нейронов коры головного мозга белых крыс при введении аргентумарабиногалактана

Как в раннем, так и в отдалённом периоде обследования в группах нАГ100 и нАГ500 при помощи просвечивающего микроскопа FEI Techni 2G с полевым эмиттером и энергодисперсным детектором в структуре нервной ткани были обнаружены наночастицы серебра сферической формы диаметром до 20 нм, что свидетельствует о том, что наночастицы в составе полимерной матрицы арабиногалактан способны проникать через гемато-энцефалический барьер (Рисунок 3.20, 3.21).

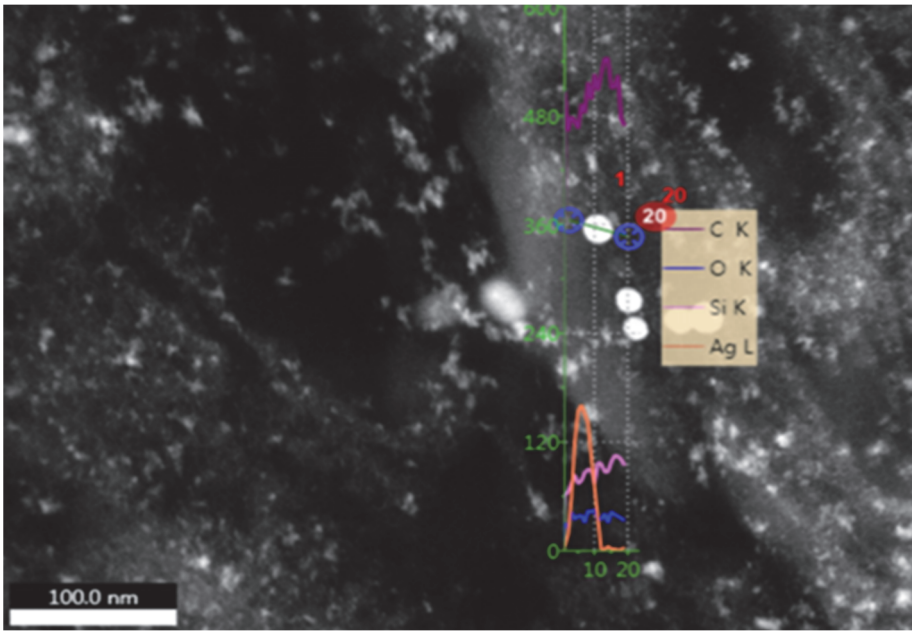

Рисунок 3.20 – Микрофотография образца нервной ткани животного группы нАГ100 в раннем периоде обследования. Сферические образования в структуре ткани содержат серебро. Ув. ×52000

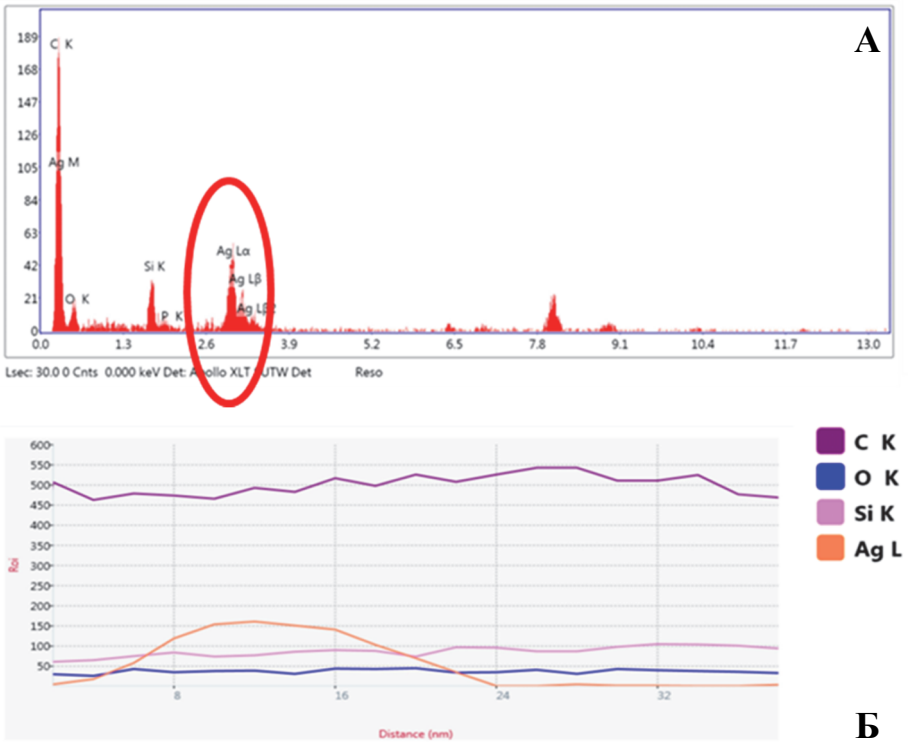

Рисунок 3.21 – Результаты спектрометрии участка ткани головного мозга (А) и профиль обнаруженных элементов (Б) животного, подверженного воздействию нАГ100 (отдалённый период обследования)

3.6. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков bcl-2 и caspase-3 при введении аргентумарабиногалактана

Для оценки воздействия исследуемого нанобиокомпозита на клеточном и субклеточном уровнях было проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии белков caspase-3 и bcl-2. В качестве информативных показателей были выбраны тёмные нейроны, а также иммунопозитивные и иммунонегативные нормальные нейроны.

Проведённое исследование экспрессии апоптоз-ингибирующего белкового фактора bcl-2 в раннем периоде обследования показало, что при введении КС статистически значимых, по сравнению с контролем, изменений процентного содержания всех типов исследуемых клеток по отношению к их общему количеству на площади 0,2 мм^2 практически не происходит. При введении АГ происходит статистически значимое, по сравнению как с контролем, так и с КС, увеличение процентного содержания всех типов исследуемых клеток. При введении нАГ100 наблюдается сходная с АГ картина – также увеличивается процентное содержание всех типов клеток, в том числе тёмных (в 2,19 раза, по сравнению с контрольным значением, и в 1,32 раза – по сравнению с АГ). Аналогичная направленность выявлена и при определении содержания нормальных иммунопозитивных клеток. Однако данные изменения статистически не значимы, по сравнению с основной группой сравнения (АГ) (Рисунок 3.22).

В группе нАГ500, напротив, наблюдалось статистически значимое, по сравнению как с АГ, так и с нАГ100, повышение содержания тёмных клеток, что может быть обусловлено вовлечением клеток в процесс активации экспрессии антиапоптотического белка bcl-2, приводящей к гибели клеток путём апоптоза (Рисунок 3.23). Активацию процесса апоптоза в группе нАГ500 также подтверждает увеличение содержания нормальных иммунопозитивных клеток.

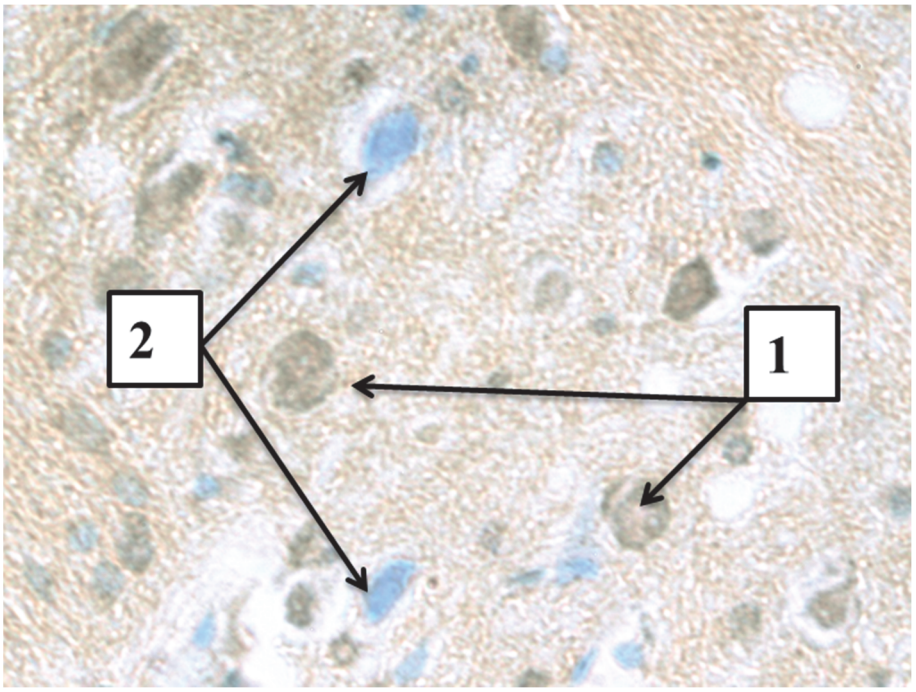

Рисунок 3.22 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка bcl-2 в группе нАГ100 (ранний период обследования): 1 – нормальные иммунопозитивные нейроны; 2 – нормальные иммунонегативные нейроны. Ув. ×400

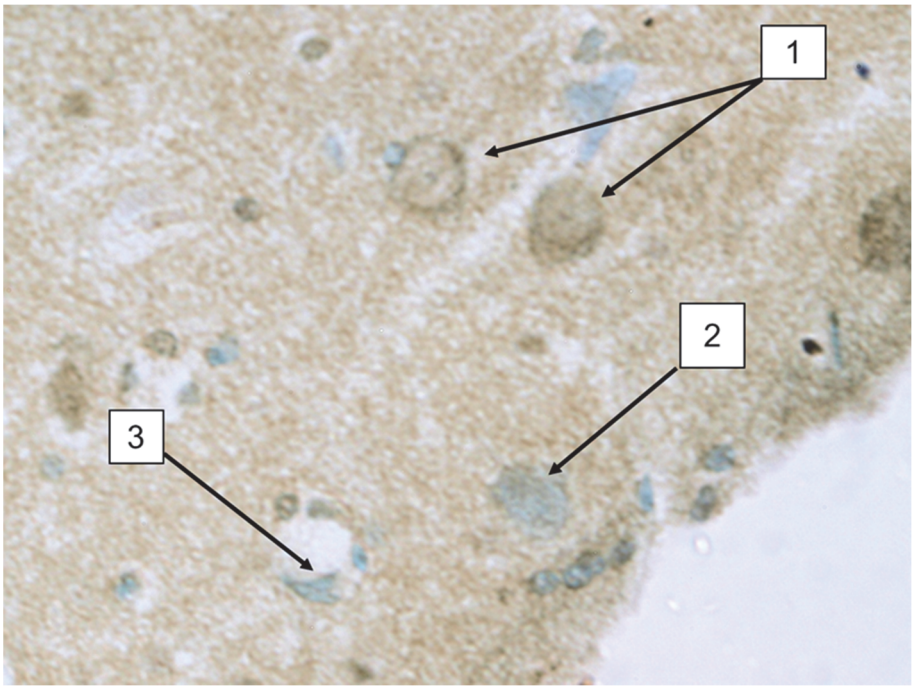

Рисунок 3.23 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка bcl-2 в группе нАГ500 (ранний период обследования): 1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки; 3 – тёмные нейроны. Ув. ×400

За счёт повышения процентного содержания вышеуказанных клеток наблюдается компенсаторное снижение числа клеток, не несущих экспрессию белка bcl-2 (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Экспрессия белка bcl-2 при воздействии АГ, нАГ100 и нАГС500 в раннем периоде обследования, % от общего количества клеток в 0,2 мм^2 (Me (Q_{25}–Q_{75}); n = 10)

Группы	**Тёмные клетки**	**Нормальные иммунопозитивные клетки**	**Нормальные иммунонегативные клетки**
Контроль	2,01 (1,86–2,19)	2,07 (1,55–2,19)	95,92 (94,99–97,33)
КС	1,59 (1,45–1,79)	1,52 (1,22–1,84)	96,89 (96,43–97,06)
АГ	3,33 (3,00–4,07)*; #	3,89 (2,46–5,93)*; #	93,08 (90,23–93,99)*; #
нАГ100	4,41 (4,13–5,03)*; #	5,04 (4,31–5,35)*; #	90,55 (89,94–91,41)*; #
нАГ500	4,81 (3,83–5,45)*; #; ♦	6,20 (4,91–6,57)*; #; ♦	88,99 (85,45–97,89)♦

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0,01$ * – по сравнению с группой контроля, # – по сравнению с группой КС, ♦ – по сравнению с группой АГ. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна – Уитни

При обследовании в отдалённом периоде изучаемые показатели в группе, получившей АГ, не отличались от таковых в группах контроля и КС, в то время как в группе нАГ100 наблюдалось статистически значимое, по отношению к группе АГ, изменение содержания нормальных иммунопозитивных и иммунонегативных клеток, содержание тёмных клеток увеличилось лишь по отношению к группе КС (Рисунок 3.24).

В группе АГ500 наблюдалось значительное повышение содержания тёмных клеток (по сравнению с АГ – в 3,6 раза) и нейронов с экспрессией белка bcl-2, что может свидетельствовать о пролонгированном апоптотическом процессе, который достаточно активен, чтобы вызвать индукцию анти-апоптотического белка (Рисунок 3.25, Таблица 3.5).

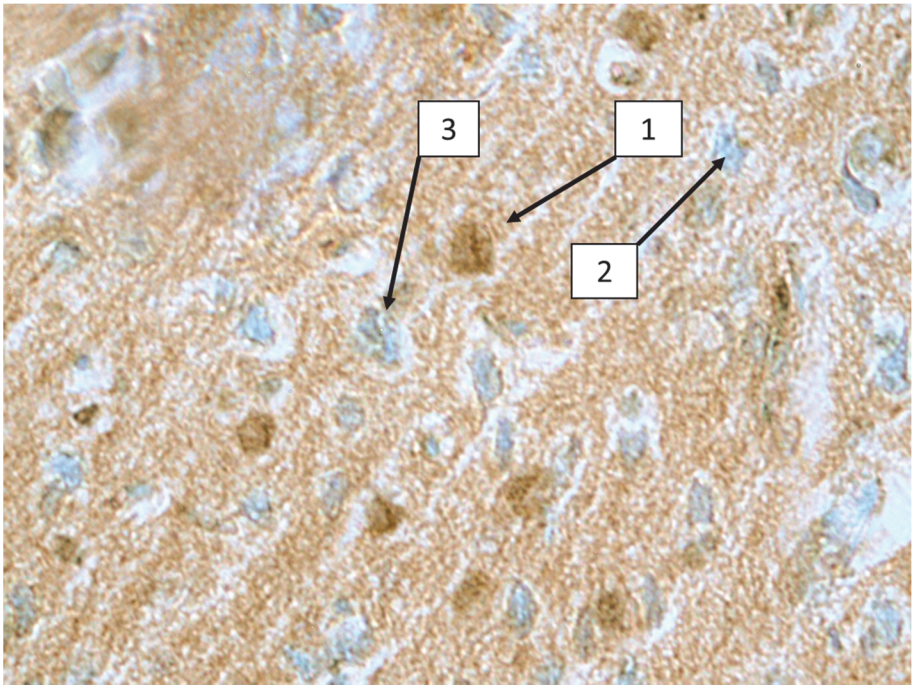

Рисунок 3.24 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка bcl-2 в группе нАГ100 (отдалённый период обследования): 1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки; 3 – тёмные нейроны. Ув. ×400

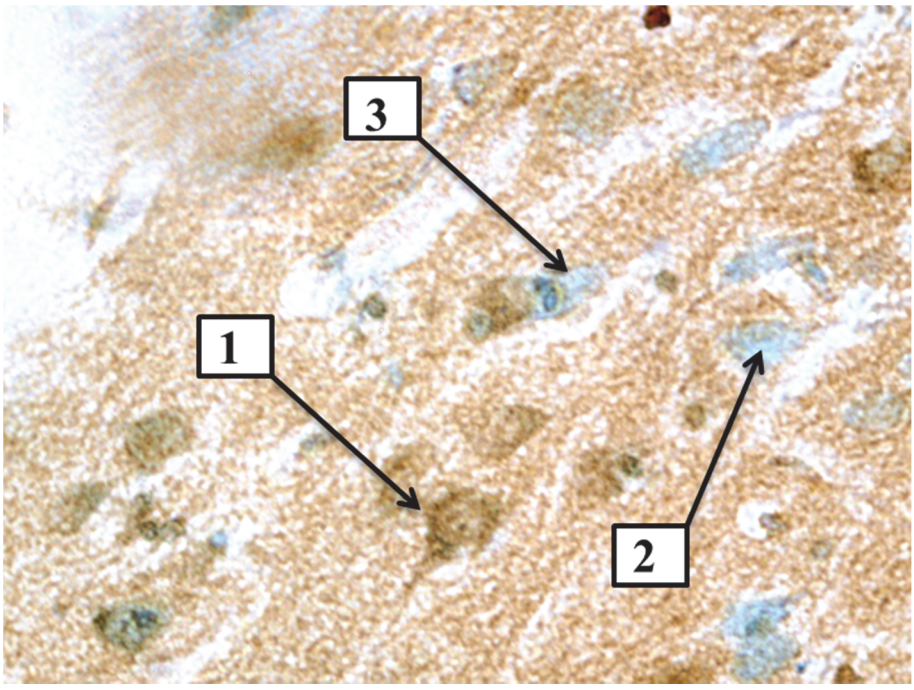

Рисунок 3.25 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка bcl-2 в группе нАГ500 (отдалённый период обследования): 1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки; 3 – тёмные нейроны. Ув. ×400

Таблица 3.5 – Экспрессия белка bcl-2 при воздействии АГ, нАГ100 и нАГС500 в отдалённом периоде обследования, % от общего количества клеток в 0,2 мм^2 (Med (Q_{25}–Q_{75}); n = 10)

Группы	Тёмные клетки	Нормальные иммунопозитивные клетки	Нормальные иммунонегативные клетки
Контроль	3,14 (2,07–4,91)	1,42 (1,12–1,95)	95,44 (93,26–95,61)
КС	2,76 (2,18–3,50)	1,38 (1,16–2,21)	95,86 (94,69–96,14)
АГ	3,65 (2,22–5,12)	2,88 (2,21–3,36)	93,47 (89,74–94,96)
нАГ100	6,20 (4,32–7,45)$^{\#}$	8,05 (6,83–8,89)$^{*;\ \#;\ \blacklozenge}$	85,75 (84,11–88,55)$^{\#;\ \blacklozenge}$
нАГ500	13,18 (11,67–16,67)$^{*;\ \#;\ \blacklozenge;\ \S}$	7,27 (5,49–7,50)$^{*;\ \#;\ \blacklozenge}$	79,55 (77,44–81,98)$^{*;\ \#;\ \blacklozenge;\ \S}$

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0,01$ * – по сравнению с группой контроля, $^{\#}$ – по сравнению с группой КС, $^{\blacklozenge}$ – по сравнению с группой АГ, § – по сравнению с группой нАГ100. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна – Уитни

Особый интерес представляло сравнение полученных результатов в динамике обследования не относительно группы контроля, а относительно ответной реакции на введение «чистого» АГ. При введении нАГ100 обращает на себя внимание резкое возрастание в динамике эксперимента количества тёмных и нормальных иммунопозитивных к белку bcl-2 клеток, что может свидетельствовать об активном и пролонгированном воздействии наночастиц серебра на нервные клетки, которое сохраняется и через 6 мес. после воздействия. Увеличение количества нормальных клеток с экспрессией белка bcl-2 указывает на поддержание протективных антиапоптотических процессов, однако повышение числа тёмных клеток в отдалённом периоде свидетельствует о нарастании гибели нейронов в ответ на воздействие полимерного нанобиокомпозита нАГ100 (Рисунок 3.26).

При динамическом исследовании полученных результатов в группе нАГ500 наблюдалась аналогичная с группой нАГ100 направленность изменений. Однако в данном случае выявлено значительное увеличение тёмных клеток в отдалённом периоде обследования по сравнению как с группой АГ, так и с группой нАГ100,

что может быть связано с более выраженным эффектом воздействия высокой дозы на процессы гибели нейронов (Рисунок 3.27).

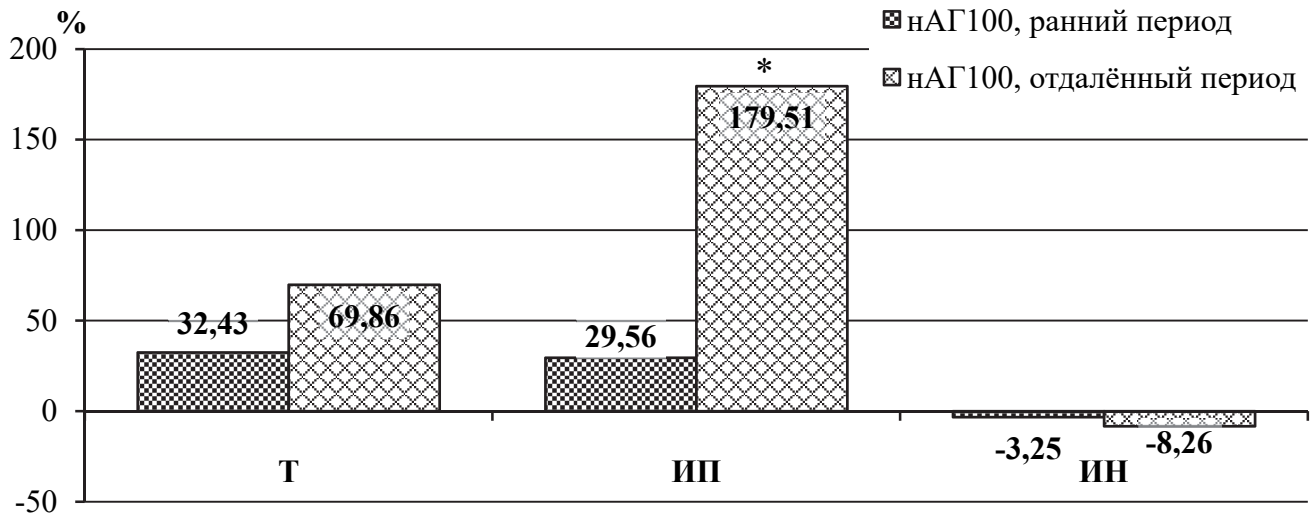

Рисунок 3.26 – Динамика изменения по отношению к группе АГ: % содержания тёмных нейронов (Т), нормальных иммунопозитивных (ИП) и нормальных иммунонегативных (ИН) к белку bcl-2 клеток при воздействии нАГ100 в раннем и отдалённом периодах обследования; * – различия статистически значимы, по сравнению с ранним периодом обследования, при $p < 0,01$

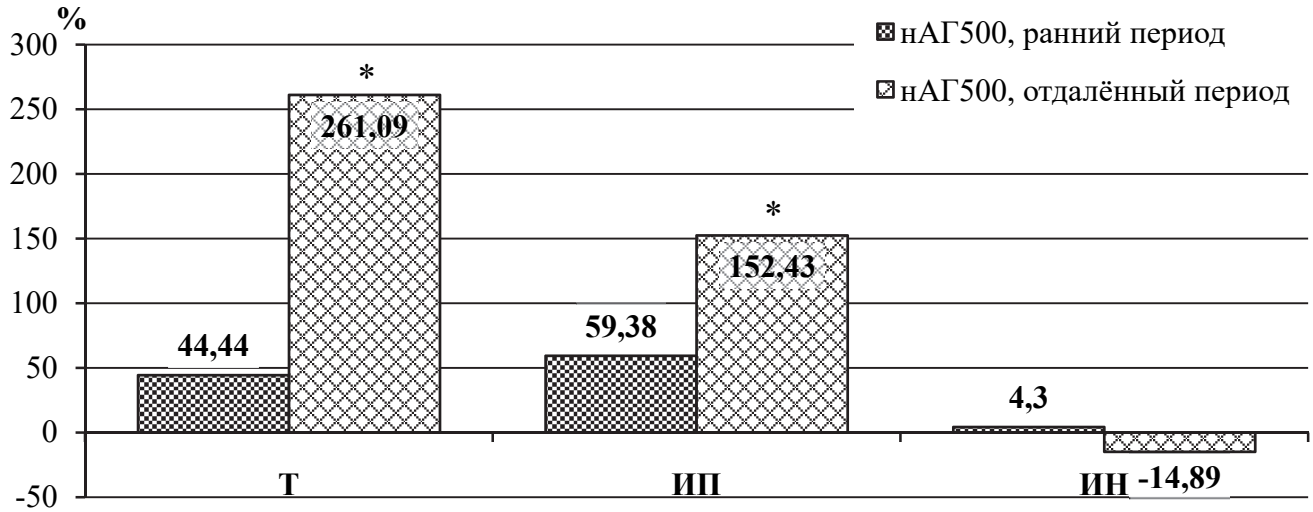

Рисунок 3.27 – Динамика изменения по отношению к группе АГ: % содержания тёмных нейронов (Т), нормальных иммунопозитивных (ИП) и нормальных иммунонегативных (ИН) к белку bcl-2 клеток при воздействии нАГ500 в раннем и отдалённом периоде обследования; * – различия статистически значимы, по сравнению с ранним периодом обследования, при $p < 0,01$

Таким образом, в отдалённом периоде обследования при изучении экспрессии белка bcl-2 наблюдались статистически значимые изменения практически всех показателей при воздействии нАГ100 и нАГ500. Говоря

другими словами, индукция протективного белка bcl-2 нарастает с течением времени, что подтверждает продолжающийся длительное время апоптотический процесс. В связи с этим представляет интерес обследование содержания проапоптотического белка caspase-3, индукция которого свидетельствует о необратимом процессе программированной клеточной гибели.

При исследовании экспрессии эффекторного белка caspase-3, который активирует процесс апоптоза, наблюдалась следующая картина: в раннем периоде обследования при введении АГ, не содержащего наночастиц серебра, показатели экспрессии белка статистически значимо не изменились, по сравнению как с группой контроля, так и с группой КС. Аналогичная картина наблюдалась в отдалённом периоде. При воздействии нАГ100 выявлено статистически значимое, по сравнению с группой АГ, увеличение содержания тёмных клеток, сокращение на единицу площади количества нормальных иммунонегативных клеток без экспрессии проапоптотического белка caspase-3 (Рисунок 3.28)

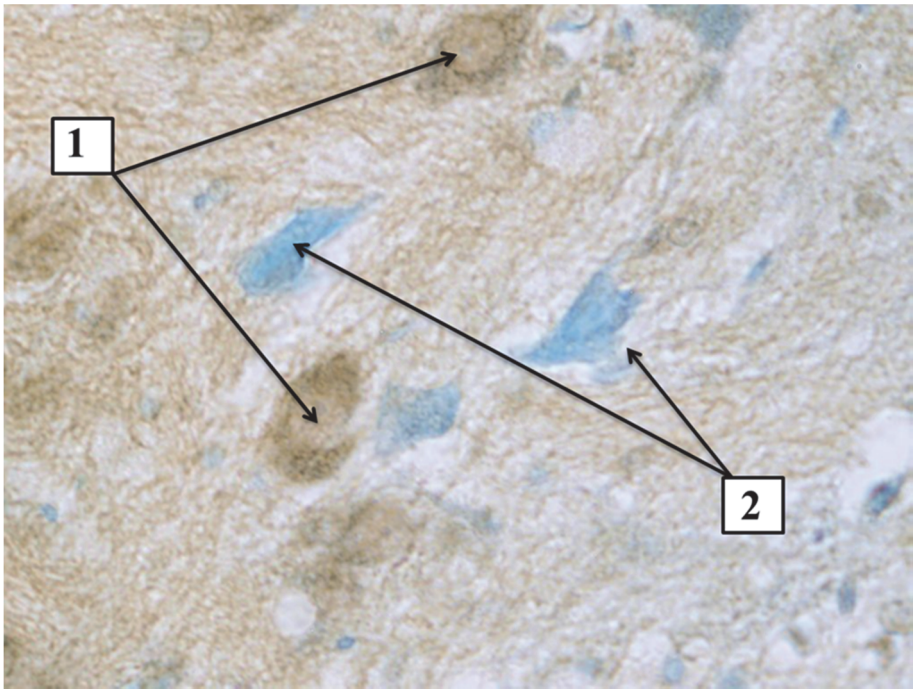

Рисунок 3.28 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка caspase-3 в группе нАГ100 (ранний период обследования): 1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки. Ув. ×400

В группе нАГ500 выявлены аналогичные изменения, при этом более чем в 2,5 раза, по сравнению с группой АГ, возросло содержание нормальных

иммунопозитивных клеток. Полученные результаты свидетельствуют об активации апоптотических процессов уже на 10-й день после воздействия нанобиокомпозита (Рисунок 3.29, Таблица 3.6).

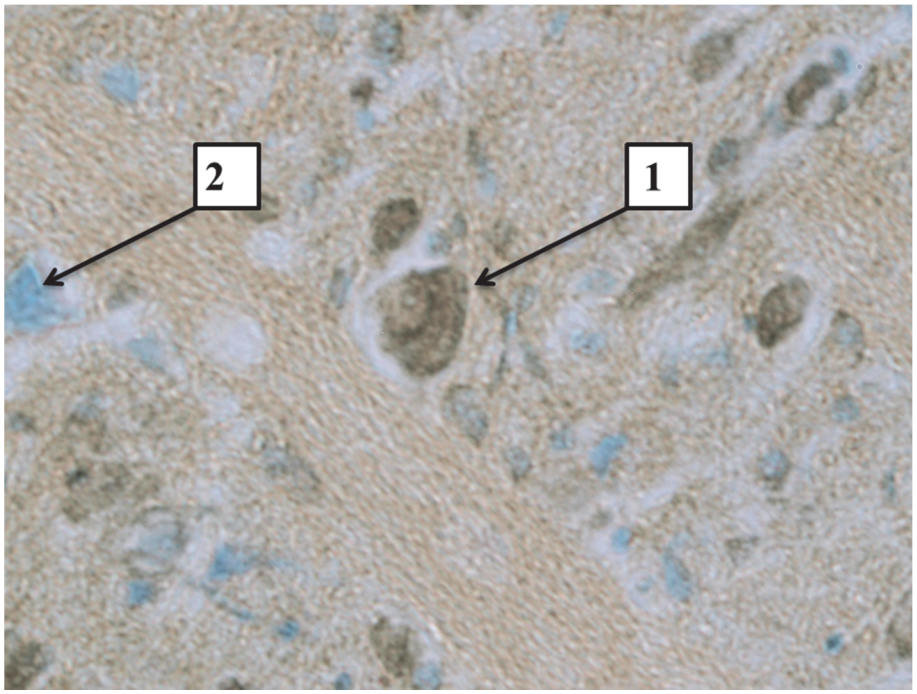

Рисунок 3.29 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка caspase-3 в группе нАГ500 (ранний период обследования): 1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки. Ув. ×400

Таблица 3.6 – Экспрессия белка caspase-3 при воздействии АГ, нАГ100 и нАГС500 в раннем периоде обследования, % от общего количества клеток в 0,2 мм^2 (Me (Q_{25}–Q_{75}); n = 10)

Группы	**Тёмные клетки**	**Нормальные иммунопозитивные клетки**	**Нормальные иммунонегативные клетки**
Контроль	2,56 (1,79–2,74)	1,93 (1,77–2,09)	95,51 (94,61–95,67)
КС	1,91 (1,62–2,49)	1,67 (1,14–2,49)	96,42 (95,15–96,76)
АГ	2,16 (1,91–2,99)	1,92 (1,66–2,11)	95,92 (95,21–96,51)
нАГ100	3,89 (3,65–5,22)*; #; ♦	4,90 (2,34–12,78)	91,21 (80,85–92,06)*; #; ♦
нАГ500	6,58 (5,88–8,55)*; #; ♦	5,10 (3,18–8,24)*; #; ♦	88,32 (84,57–90,20)*; #; ♦

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0,01$ * – по сравнению с группой контроля, # – по сравнению с группой КС, ♦ – по сравнению с группой АГ. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна – Уитни

В отдалённом периоде обследования в группах нАГ100 и нАГ500 выявлено статистически значимое изменение содержания всех типов изучаемых клеток. Особое внимание обратило на себя повышение количества тёмных нейронов, причём в группе нАГ500 – более чем в 7 раз, по сравнению с группой АГ, и в 1,8 раза – по сравнению с группой нАГ100. Вышесказанное позволяет с уверенностью связать данные изменения с воздействием наносеребра в составе нанокомпозита на внутриклеточную организацию нервной ткани (Рисунок 3.30, 3.31, Таблица 3.7).

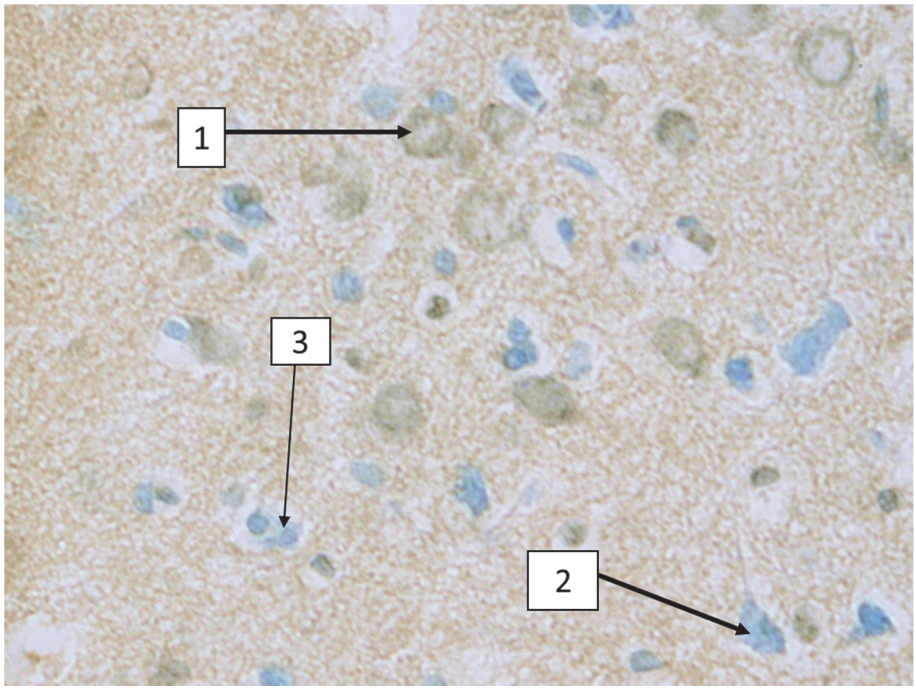

Рисунок 3.30 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка caspase-3 в группе нАГ100 (отдалённый период обследования):
1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки; 3 – тёмные нейроны. Ув. ×400

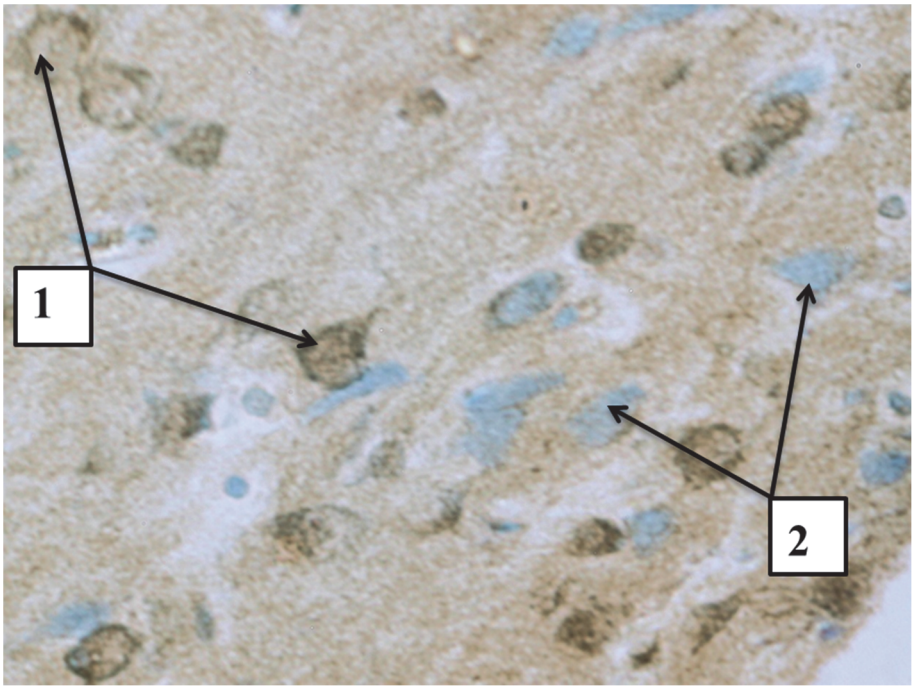

Рисунок 3.31 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка caspase-3 в группе нАГ500 (отдалённый период обследования):
1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки. Ув. ×400

Таблица 3.7 – Экспрессия белка caspase-3 при воздействии АГ, нАГ100 и нАГС500 в отдалённом периоде обследования, % от общего количества клеток в 0,2 мм^2, Me (Q_{25}–Q_{75}); n = 10)

Группы	**Тёмные клетки**	**Нормальные иммунопозитивные клетки**	**Нормальные иммунонегативные клетки**
Контроль	2,60 (2,17–3,52)	1,45 (0,89–1,74)	95,95 (94,93–96,75)
КС	2,29 (1,75–2,64)	2,25 (1,74–2,67)	95,46 (05,04–96,53)
АГ	1,69 (0,33–2,21)	0,00 (0,00–2,03)	98,31 (94,83–98,73)
нАГ100	7,05 (6,25–11,45)*; #; ♦	8,89 (6,26–31,24)*; #; ♦	84,06 (59,71–86,35)*; #; ♦
нАГ500	13,20 (10,74–18,24)*; #; ♦; §	6,96 (5,71–9,52)*; #; ♦	79,84 (74,29–80,18)*; #; ♦

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0{,}01$ * – по сравнению с группой контроля, # – по сравнению с группой КС, ♦ – по сравнению с группой АГ, § – по сравнению с группой нАГ100. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна – Уитни

В динамике обследования препаратов животных, получивших введение нАГ100, наблюдалось нарастание, по сравнению с группой АГ, количества тёмных и нормальных иммунопозитивных клеток с экспрессией белка caspase-3 (в 3,9 и 5 раз соответственно). Данный факт, а также сокращение нормальных клеток на единицу площади нервной ткани в совокупности свидетельствует о прогрессировании процесса апоптоза в отдалённом периоде после окончания воздействия (Рисунок 3.32).

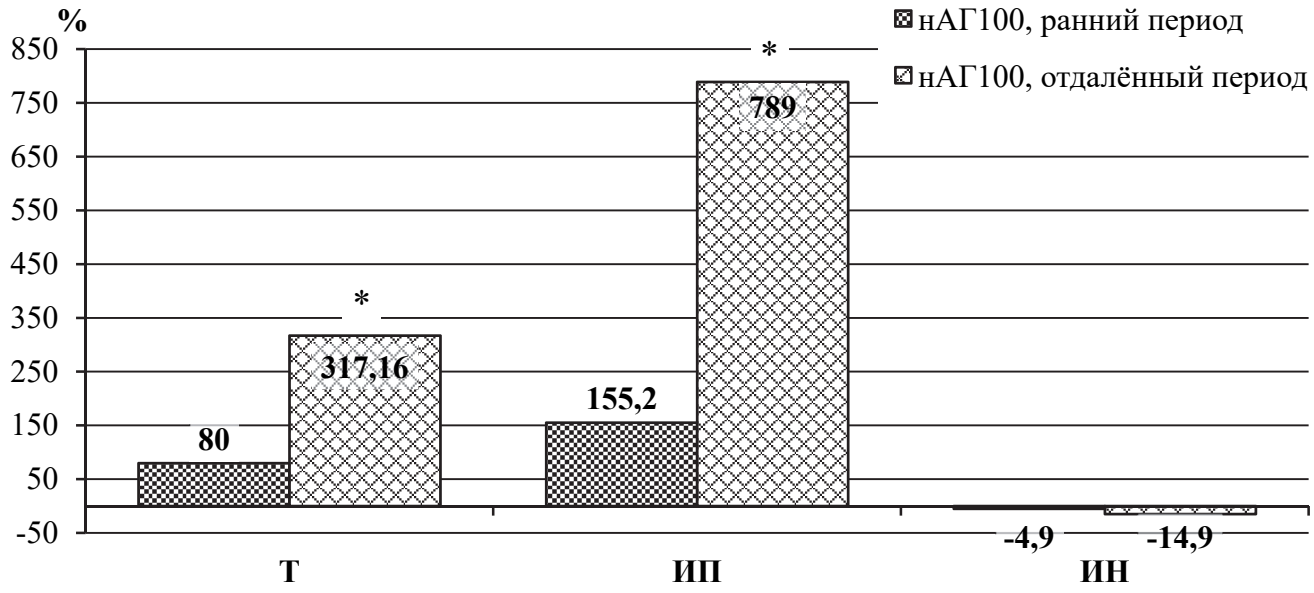

Рисунок 3.32 – Динамика изменения по отношению к группе АГ: % содержания тёмных нейронов (Т), нормальных иммунопозитивных (ИП) и нормальных иммунонегативных (ИН) к белку caspase-3 клеток при воздействии нАГ100 в раннем и отдалённом периодах обследования; * – различия статистически значимы, по сравнению с ранним периодом обследования, при $p < 0,01$

Динамика обследования группы нАГ500 позволяет констатировать аналогичный с группой нАГ100 эффект: с течением времени наблюдалось увеличение содержания тёмных нейронов и нормальных иммунопозитивных клеток (Рисунок 3.33).

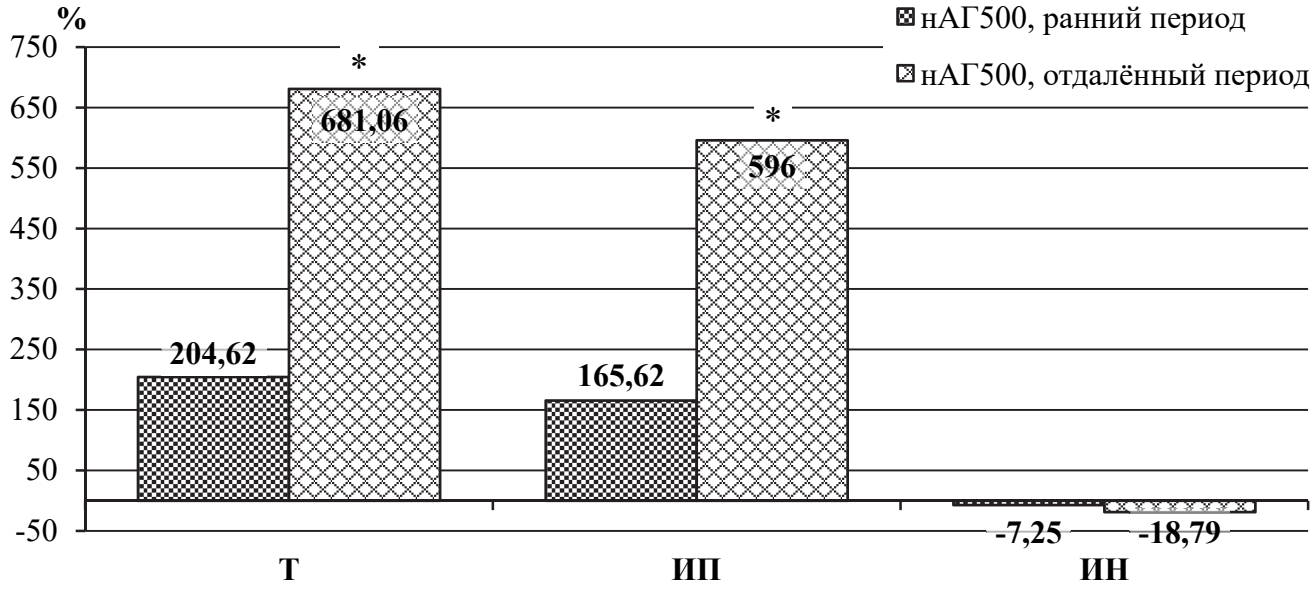

Рисунок 3.33 – Динамика изменения по отношению к группе АГ: % содержания тёмных нейронов (Т), нормальных иммунопозитивных (ИП) и нормальных иммунонегативных (ИН) к белку caspase-3 клеток при воздействии нАГ500 в раннем и отдалённом периодах обследования; * – различия статистически значимы, по сравнению с ранним периодом обследования, при $p < 0,01$

При соотнесении показателей экспрессии регуляторных белков с временем обследования и вводимой доза наночастиц выявлена определённая закономерность. В препаратах животных, получивших нАГ100, в раннем периоде обследования при оценке экспрессии белка caspase-3 погибших клеток в 2,5 раза больше, чем таковых при оценке экспрессии белка bcl-2. Количество нормальных иммунопозитивных клеток с экспрессией белка bcl-2 возросло, по сравнению с группой АГ, незначительно, тогда как аналогичный показатель клеток с экспрессией белка caspase-3 выше такового в группе АГ в 5,25 раза. При сравнении групп нАГ500 различия также ярко выражены: так, число тёмных нейронов при оценке экспрессии белка caspase-3 больше в 4,6 раза, по сравнению с аналогичным показателем при оценке экспрессии белка bcl-2. В отдалённом периоде обследования складывается аналогичная ситуация: в группе нАГ100 число тёмных нейронов и нормальных иммунопозитивных клеток с экспрессией белка caspase-3 значительно выше аналогичных показателей экспрессии белка bcl-2 (в 4,5 и 4,4 раза соответственно), что свидетельствует о

продолжающемся активном апоптотическом процессе, подавляющем действие антиапоптотического белка. В группе нАГ500 в отдалённом периоде обследования значения данных показателей при оценке экспрессии белка caspase-3 увеличивались, по сравнению с экспрессией белка bcl-2, в 2,6 и 3,9 раза соответственно. Все вышесказанное свидетельствует о том, что при воздействии нанобиокомпозитов на матрице арабиногалактан наблюдается активный апоптотический процесс, который продолжается и через 6 месяцев посте окончания воздействия.

3.7. Дискриминантный анализ показателей экспрессии белков апоптоза при введении аргентумарабиногалактана

Для математического подтверждения результатов иммуногистохимического исследования был использован многофакторный дискриминантный анализ, который позволил определить наиболее информативные показатели, различающие процентное содержание клеток нервной ткани, экспрессирующих тот или иной вид белков в раннем и отдалённом периоде обследования. На основе дискриминантного анализа из 12 проанализированных переменных, описывающих биологический ответ клеток головного мозга, были выявлены 7 наиболее информативных показателей ($p < 0,02$), позволивших разграничить воздействие серебра в зависимости от дозы и периода обследования. Данные показатели представлены в таблице 3.8. Дополнительно представлены значения критерия Фишера с соответствующими уровнями значимости переменных

Как видно из таблицы 3.8, наибольший вклад в дискриминацию вносит показатель a_1 – процентное содержание нормальных клеток с экспрессией белка bcl-2 в раннем периоде обследования.

Таблица 3.8 – Показатели информативности признаков, включённых в канонические дискриминантные функции для групп контроля, КС, АГ нАГ100 и нАГ500

№	Показатели	Критерий Фишера	*p*
a_1	Процентное содержание нормальных клеток с экспрессией bcl-2 в раннем периоде обследования	8,21	< 0,0001
a_2	Процентное содержание тёмных нейронов в раннем периоде обследования	8,14	< 0,0001
a_3	Процентное содержание нормальных клеток без экспрессии bcl-2 в раннем периоде обследования	8,13	< 0,0001
a_4	Процентное содержание нормальных клеток без экспрессии bcl-2 в отдалённом периоде обследования	5,66	< 0,001
a_5	Процентное содержание нормальных клеток с экспрессией caspase-3 в отдалённом периоде обследования	3,66	< 0,01
a_6	Процентное содержание тёмных нейронов в отдалённом периоде обследования	3,57	< 0,01
a_7	Процентное содержание нормальных клеток без экспрессии caspase-3 в отдалённом периоде обследования	3,55	< 0,01

Канонические линейные дискриминантные функции K_1 и K_2 (корень 1 и корень 2) с наиболее высокой степенью значимости ($p < 0{,}0001$) имели следующий вид:

$$\boldsymbol{K_1 = 0{,}67 + 0{,}60 \times a_1 + 0{,}65 \times a_2 + 0{,}39 \times a_3 + 0{,}78 \times a_4 - 0{,}49 \times a_5 - 0{,}56 \times a_6 - 0{,}53 \times a_7;}$$

$$\boldsymbol{K_2 = 0{,}89 + 0{,}55 \times a_1 - 0{,}55 \times a_2 - 0{,}06 \times a_3 - 0{,}11 \times a_4 + 0{,}94 \times a_5 + 0{,}50 \times a_6 + 1{,}54 \times a_7,}$$

где K_1 и K_2 – значения канонической дискриминантной функции; 0,67 и 0,89 – константы; $a_{1, 2, \ldots, 7}$ – числовые значения показателей проведённого обследования; 0,60, 0,65, …, 1,54 – коэффициенты, вычисленные с помощью дискриминантного анализа.

При проверке разбивки показателей процентного содержания точность группирования составила 92,15 %.

Кроме расчёта канонических линейных дискриминантных функций, дополнительно был построен график положения объектов пяти групп в координатах первой и второй канонических дискриминантных функций. Средние

значения канонических величин для каждой группы в корнях 1 и 2 представлены в таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Средние значения канонических величин для групп контроля, КС, АГ, нАГ100, нАГ500 (корень 1 и корень 2)

Группа	**Корень 1**	**Корень 2**
Контроль	2,3	1,2
КС	2,5	1,6
АГ	2,2	–0,9
нАГ100	–1,1	–2,7
нАГ500	–5,4	1,5

На рисунке 3.34 представлено графическое изображение на плоскости центроидов канонических величин групп контроля, КС, АГ, нАГ100, нАГ500, по которому проанализировано относительное расположение групп в признаковом пространстве и выявлены наиболее удалённые и близко расположенные группы.

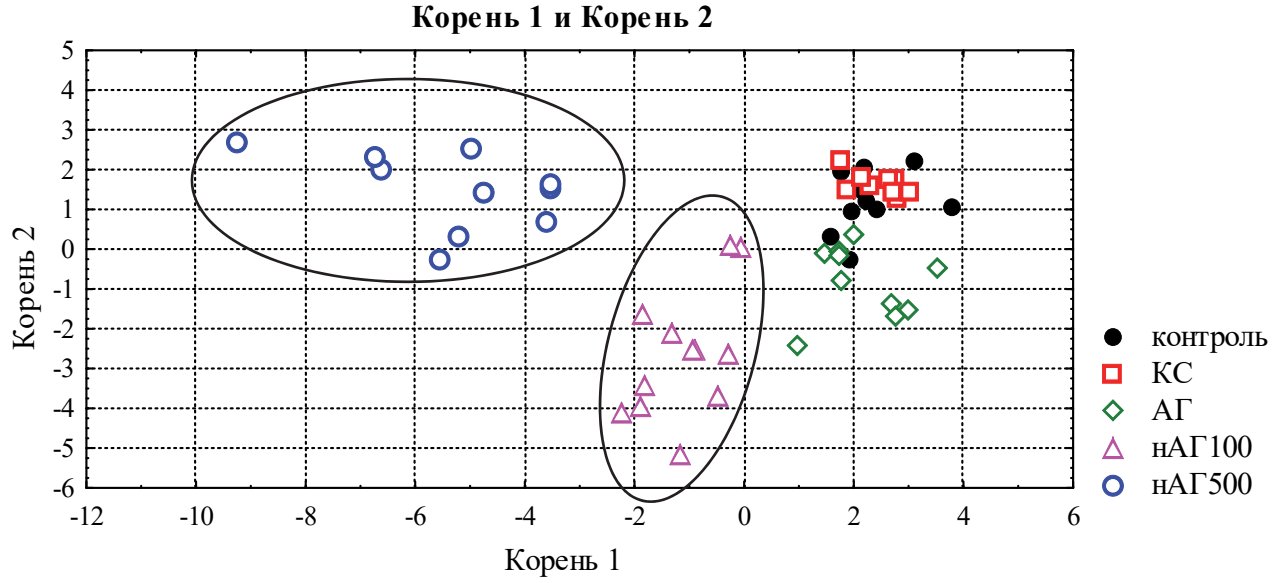

Рисунок 3.34 – Распределение групп контроля, КС, АГ, нАГ100 и нАГ500 по показателям процентного содержания клеток

Как видно из рисунка, каждая каноническая дискриминантная функция вносит различный вклад в дискриминацию между группами. В корне 1

наблюдалась высокая степень дискриминации нАГ100 и нАГ500, имеющих отрицательные значения координат центроида в данном корне, относительно других групп. В дискриминацию между группами контроля, КС и АГ корень 1 вносил незначительный вклад, координаты этих групп располагались в положительной зоне. Вторая каноническая дискриминантная функция (корень 2) вносила более высокий вклад в дискриминацию между группами нАГ100 и нАГ500 как между собой, так и по отношению к другим группам.

Расстояние Махаланобиса между групповыми центроидами контрольной группы, КС и АГ не превышало 13,3 ($F = 4{,}82$; $p < 0{,}001$), в то время как между группами контроля и нАГ100 и нАГ500 расстояние составляет, соответственно, 32,1 ($F = 12{,}79$; $p < 0{,}0001$) и 69,7 ($F = 25{,}23$; $p < 0{,}0001$). Между группами нАГ100 и нАГ500 расстояние Махаланобиса составляло 40,9 ($F = 16{,}3$, $p < 0{,}001$). Таким образом, анализ относительного расположения групп, связанных с АГ и нанобиокомпозитами на его основе, в признаковом пространстве показал, что наиболее удалёнными по дифференцирующим признакам являются группы нАГ100 и нАГ500, находящиеся, согласно координатам центроидов, в отрицательной области оси координат.

В целом исследование воздействия АГ и нанобиокомпозита в различных дозировках на его основе показало наличие изменений как в структуре нервной ткани, так и в функциональном состоянии отдельных клеток. По результатам морфологических исследований животных группы АГ выявлено расширение периваскулярных пространств, наличие нейронофагии во всех периодах обследования. При воздействии нАГ в обеих дозах к увеличению периваскулярных пространств присоединялись расширение проводящих волокон, набухание миоцитов и эндотелиоцитов сосудов, утолщение стенки артерий, появление большого количества тёмных нейронов, нарушения их ультраструктуры. Указанные изменения нарастали в отдалённом периоде обследования. По результатам исследования биохимических показателей при введении нАГ100 наблюдалась активация защитных звеньев антиоксидантной системы, при этом уровень конечных продуктов перекисного окисления липидов

оставался неизменным. При изучении среднесмертельной дозы ангентумарабиногалактан отнесён к IV классу опасности (малоопасное вещество).

Использование иммуногистохимического метода показало, что воздействие нАГ100 в краткосрочной перспективе вызывает начальную дисрегуляцию механизмов программированной клеточной смерти, которая в периоде дожития приводит к состоянию клетки с характерными признаками активного апоптотического процесса. Скорее всего, апоптоз протекает по митохондриальному типу, когда образовавшиеся из прокаспаз активные каспазы подавляют деятельность антиапоптотического белка bcl-2. Высокий уровень последнего свидетельствует о том, что «противоборство» белков продолжается в течение длительного периода после воздействия нанобиокомпозита.

При воздействии нАГ500 в раннем периоде обследования наблюдалось повышение содержания тёмных клеток, что свидетельствует об активации апоптотического процесса путём усиленной продукции белка caspase-3 сразу же после окончания воздействия в ответ на введение повышенной дозы наночастиц. Незначительное количество иммунопозитивных к белку bcl-2 клеток может говорить о некотором отставании индукции протективного антиапоптотического белка. Предположительно, в ответ на начавшуюся продукцию каспазы произошла активация антиапоптотического белка bcl-2, однако её активности не хватило для предотвращения апоптотического процесса. В отдалённом периоде обследования так же, как при воздействии нАГ100, выявлялось повышение количества погибших клеток, экспрессирующих белок bcl-2, однако активация выработки данного белка нормальными клетками резко сокращалась. Напротив, индукция белка caspase-3 значительно возрастала, что характеризует активный апоптотический процесс.

В раннем и отдалённом периодах обследования в структуре нервных клеток были обнаружены наночастицы серебра, что подтверждает факт их проникновения через гемато-энцефалический барьер.

ГЛАВА 4. ХАРАКТЕР НАРУШЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ АРГЕНТУМПОЛИ-1-ВИНИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛА

4.1. Определение среднесмертельной дозы аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола

При внутрижелудочном введении нПВТ белым мышам обоего пола изучаемого препарата в дозах 1500, 3000 и 5000 мг/кг массы тела гибели животных на протяжении 14 дней не отмечено. Каких-либо отклонений в поведении, внешнем виде животных, потреблении корма и воды не наблюдалось. На протяжении всего периода наблюдения общее состояние, шерстяной покров и поведение животных – как самцов, так и самок – всех экспериментальных групп соответствовало обычному. Различий в массе между опытными и контрольными животными не наблюдалось. Половых различий в чувствительности к исследуемым субстанциям при данном способе введения не выявлено.

При вскрытии опытных и контрольных мышей обоего пола, умерщвлённых в конце эксперимента (через 14 дней), различий при макроскопическом обследовании между ними не установлено. Внутренние органы были без изменений, кровоизлияний не наблюдалось.

Таким образом, нанобиокомпозит нПВТ отнесён по параметрам токсикометрии к IV малоопасному классу веществ с LD_{50} при внутрижелудочном введении более 5000 мг/кг массы животного.

4.2. Определение биохимических показателей при введении аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола

Как и в случае с нАГ, нами были исследованы показатели общей массы тела, печени, почек и селезёнки животных до и после введения изучаемого нанобиокомпозита в раннем периоде обследования, а также индикаторы системы

АОС – активность ферментов каталазы и пероксидазы, уровень SH-глутатиона в печени, и ПОЛ – уровень МД и ДК (Таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Биохимические и интегральные показатели белых крыс через 9 суток после внутрижелудочного введения ПВТ, КС и нПВТ100 (M ± m)

Изучаемые показатели	**Контроль**	**КС**	**ПВТ**	**нПВТ100**
Масса тела до опыта, г	200,4 ± 18,9	211,3 ± 22,8	210,1 ± 21,8	211,4 ± 22,8
Масса тела после опыта, г	257,4 ± 19,4	260 ± 18,2	253,4 ± 20,2	258,6 ± 20,2
SH-глутатион в печени, мкмоль/мл	4,17 ± 0,52	4,20 ± 1,33	4,35 ± 0,48	4,23 ± 0,61
SH-глутатион в крови, мкмоль/мл	0,95 ± 0,07	0,89 ± 0,05	0,86 ± 0,10	0,96 ± 0,09
Активность каталазы, Е/мл мин	4,19 ± 1,31	4,49 ± 1,54	4,47 ± 1,26	4,56 ± 1,23
Пероксидаза, мкмоль/мл мин	225,5 ± 62,7	240,2 ± 25,3	239,6 ± 23,5	245,6 ± 28.7
МДА, мкмоль/л	1,36 ± 0,25	1,34 ± 0,29	1,35 ± 0,22	1,34 ± 0,21
ДК, усл. ед./мл	0,66 ± 0,09	0,67 ± 0,11	0,63 ± 0,19	0,65 ± 0,23
Масса печени, г	7,83 ± 1,18	7,67 ± 0,72	7,85 ± 0,53	7,83 ± 0,61
Масса левой почки, г	0,87 ± 0,14	0,86 ± 0,11	0,85 ± 0,09	1,01 ± 0,07
Масса правой почки, г	0,93 ± 0,11	0,89 ± 0,14	0.87 ± 0,12	0,93 ± 0,05
Масса селезёнки, г	0,68 ± 0,08	0,58 ± 0,11	0,69 ± 0,1	0,75 ± 0,06

По результатам исследования не выявлено статистически значимых изменений как в биохимических, так и в интегральных показателях, что может свидетельствовать об отсутствии влияния ПВТ и нанобиокомпозита на его основе на показатели ПОЛ и АОС.

4.3. Исследование концентрации серебра во внутренних органах при введении аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола

После девятикратного введения нПВТ100 наибольшее содержание серебра наблюдалось в тканях главных фильтрующих органов – почек и печени (Таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Результаты определения концентрации серебра во внутренних органах в группах контроля, КС, ПВТ, нПВТ100, мг/кг (M ± m)

Наименование группы	Мозг	Печень	Почки
Контроль	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
ПВТ	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
нПВТ100	0,05 ± 0,009	0,14 ± 0,05	0,19 ± 0,04
КС	0,07 ± 0,01	0,33 ± 0,06	0,15 ± 0,02

Как и при введении АГ, в данном случае также определено незначительное количество серебра в головном мозге, печени и почках животных, вообще не подверженных воздействию нанобиокомпозита (группы контроля и ПВТ). Данные показатели не соотносятся с показателями физиологической нормы серебра в организме человека и животных [Скальный А. В., 2004]. Как и в случае с нАГ, мы считаем, что это обусловлено низкой разрешающей способностью прибора, который был использован для проведения исследования ультрамалых концентраций вещества и рекомендован в методических рекомендациях «Оценка безопасности наноматериалов».

4.4. Морфологическое и морфометрическое исследование коры головного мозга при воздействии аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола

При обследовании морфологической структуры тканей животных, получавших чистый ПВТ, в оба периода обследования никаких изменений не обнаружено (Рисунок 4.1, 4.2).

При исследовании морфологической структуры головного мозга животных, подверженных воздействию нПВТ100, лишь в раннем периоде обследования наблюдалось незначительное расширение проводящих волокон (Рисунок 4.3). В отдалённом периоде обследования никаких изменений не отмечалось (Рисунок 4.4).

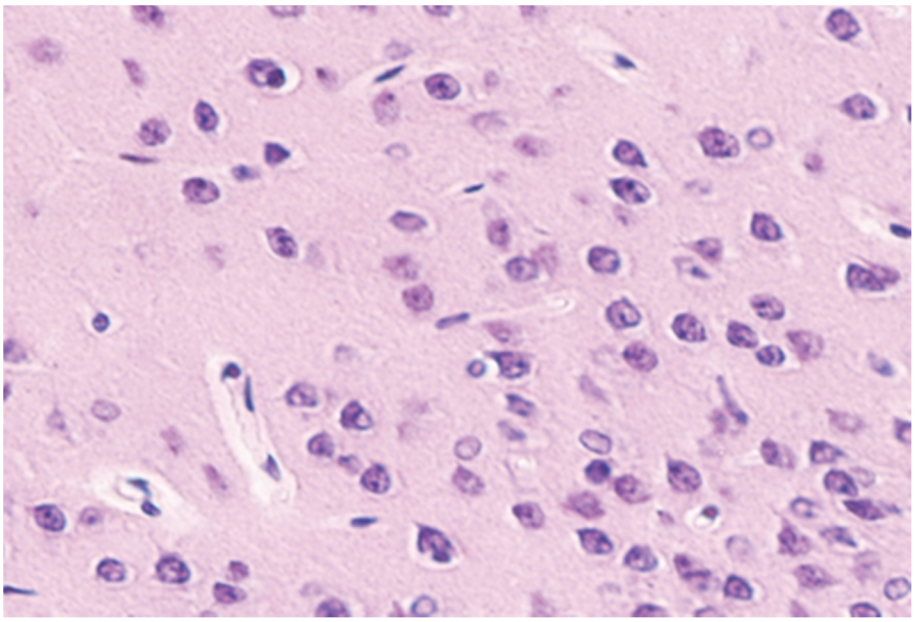

Рисунок 4.1 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы ПВТ (ранний период обследования). Все структуры в норме, нейроны не изменены. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

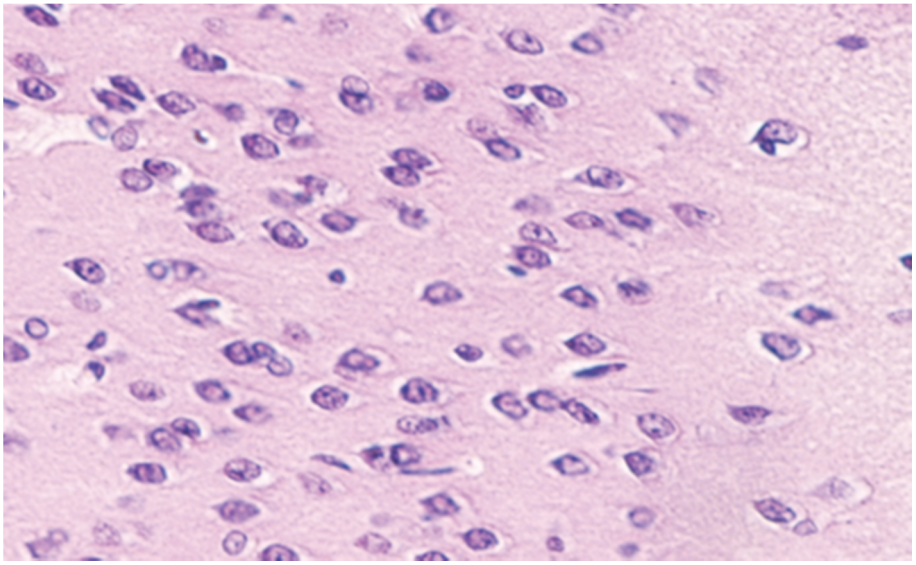

Рисунок 4.2 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы ПВТ (отдалённый период обследования). Все структуры в норме, нейроны не изменены. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

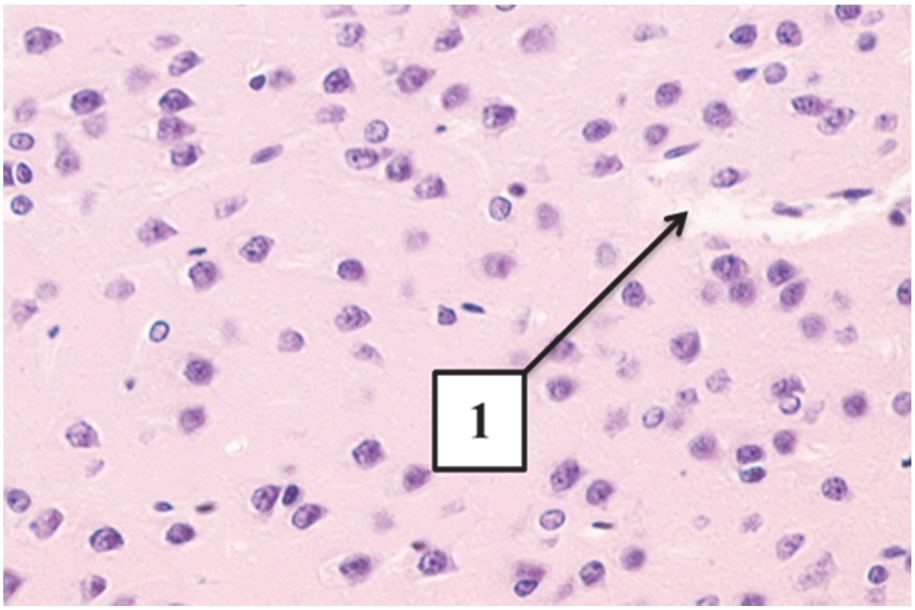

Рисунок 4.3 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нПВТ100 (ранний период обследования): 1 – незначительное расширение проводящих волокон. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

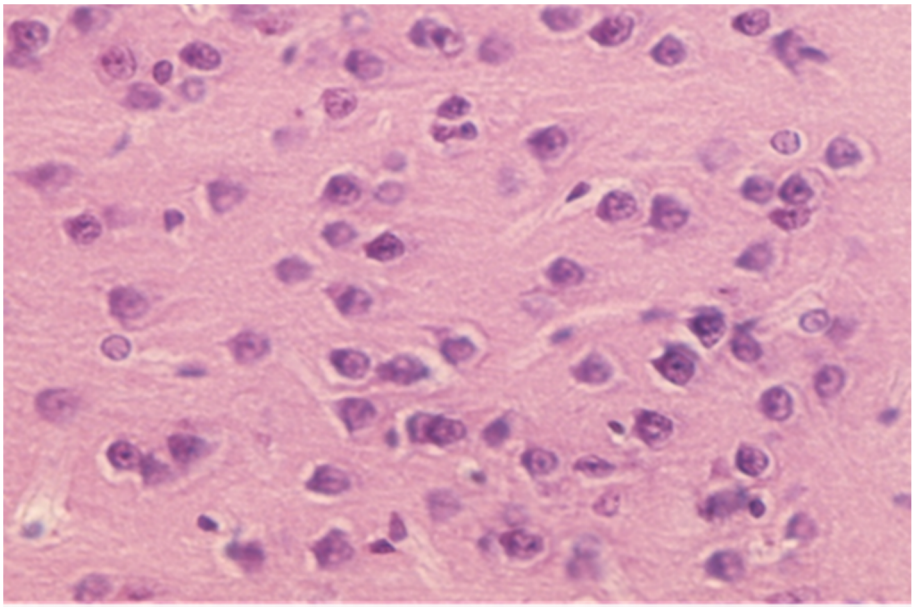

Рисунок 4.4 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нПВТ100 (отдалённый период обследования). Все структуры в норме, нейроны не изменены. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

Морфологические показатели животных группы нПВТ500 в раннем и отдалённом периодах обследования также были в норме (Рисунок 4.5, 4.6).

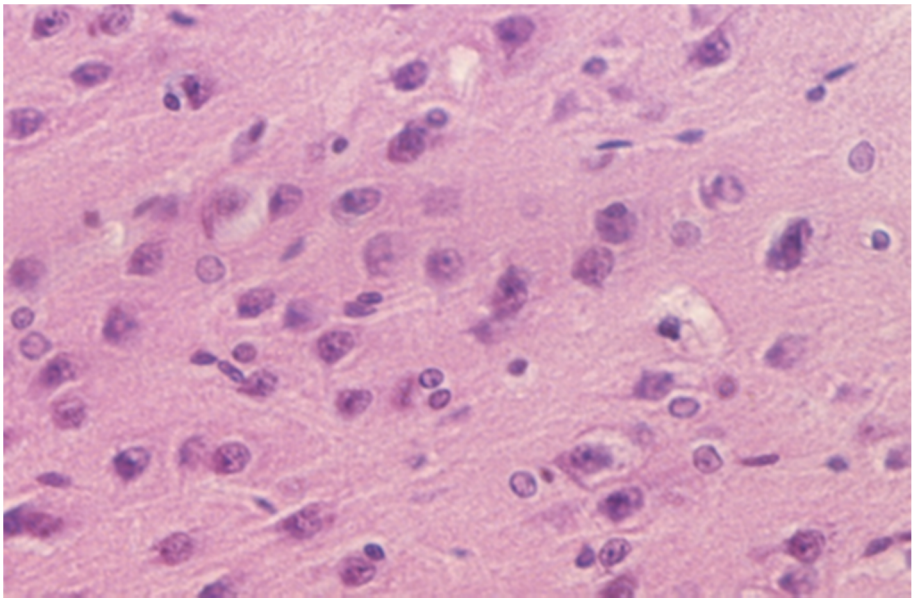

Рисунок 4.5 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нПВТ500 (ранний период обследования). Все структуры в норме, нейроны не изменены. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

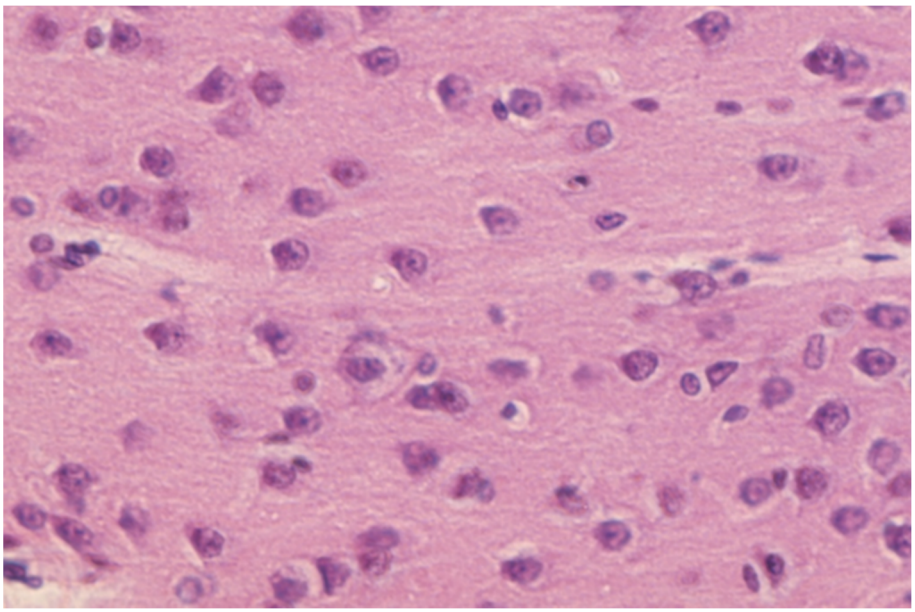

Рисунок 4.6 – Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы нПВТ500 (отдалённый период обследования). Все структуры в норме, нейроны не изменены. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×400

Результаты измерения площади митохондрий в нервных клетках особей представителей групп контроля, КС, ПВТ и нанокомпозитов на его основе

представлены в таблице 4.3. Электронограммы, на основании которых проводились измерения, представлены на рисунках 4.7 и 4.8.

Таблица 4.3 – Результаты измерения площади митохондрий (мкм^2) в нейронах животных групп контроля, КС, ПВТ, нПВТ100 и нПВТ500 в раннем и отдалённом периодах обследования

Группы	**Ранний период**	**Отдалённый период**
Контроль	0,74 (0,52–1,03)	0,76 (0,59–1,02)
КС	0,81 (0,67–1,14)	0,75 (0,59–0,98)
ПВТ	0,79 (0,54–1,09)	0,82 (0,54–0,97)
нПВТ100	0,80 (0,48–1,12)	0,73 (0,32–0,95)
нПВТ500	0,83 (0,52–1,13)	0,83 (0,55–1,12)

Как видно из таблицы 4.4, площадь митохондрий в исследуемых группах статистически значимо не отличалась, что может говорить об отсутствии влияния исследуемого нанокомпозита на основе ПВТ на данную клеточную органеллу.

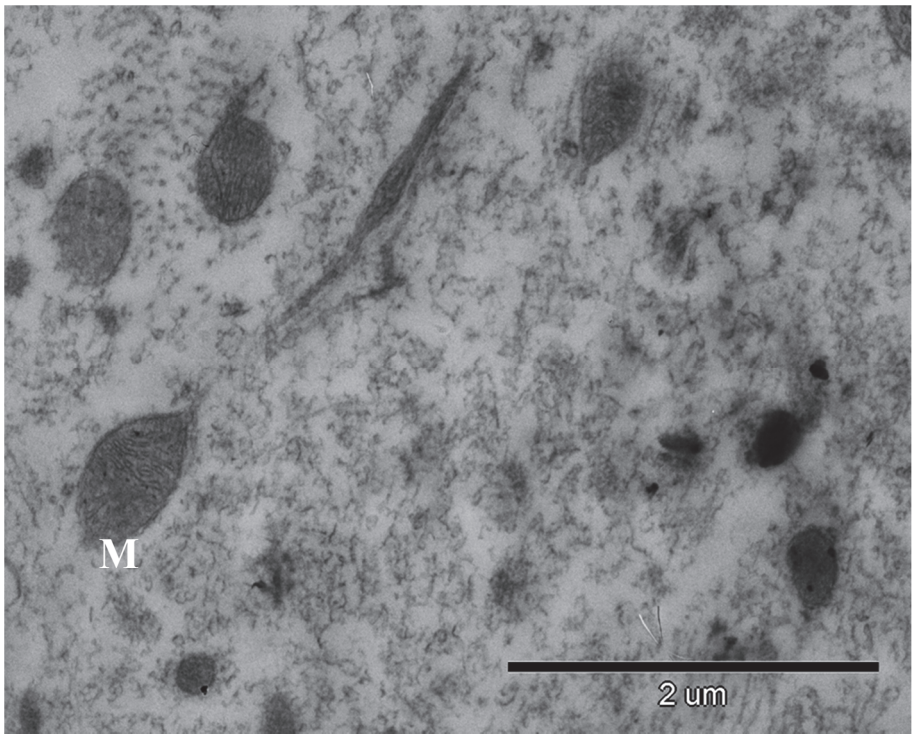

Рисунок 4.7 – Электронограмма препарата животного группы ПВТ (ранний период обследования). Митохондрии (М) использовались для вычисления площади митохондрий в группе. Ув. ×10000

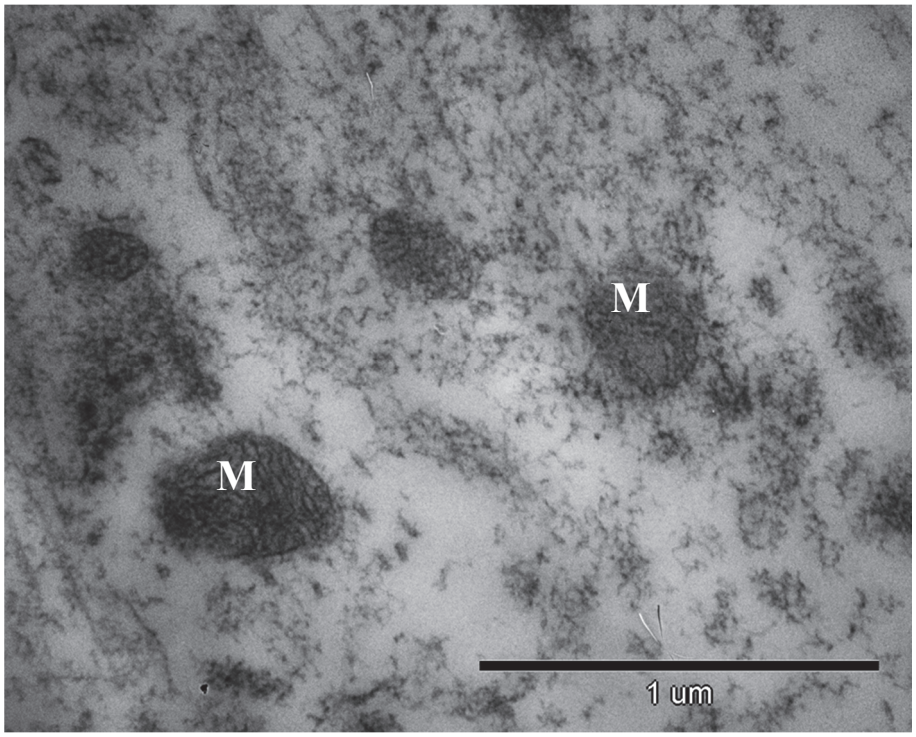

Рисунок 4.8 – Электронограмма препарата животного группы ПВТ (отдалённый период обследования). Митохондрии (М) использовались для вычисления площади митохондрий в группе. Ув. ×14000

4.5. Ультраструктурный анализ нейронов коры головного мозга белых крыс при воздействии аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола

При исследовании ультраструктуры нейронов изменений, по сравнению с контролем, не обнаружено. Просвечивающая электронная микроскопия с полевым эмиттером и энергодисперсным детектором не выявила наличие наночастиц серебра.

4.6. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков bcl-2 и caspase-3 при введении аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола

Для оценки воздействия исследуемого нанобиокомпозита на клеточном и субклеточном уровнях было проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии белков caspase-3 и bcl-2. Состояние клеток и экспрессию изучаемых белков оценивали по информативным показателям, аналогичным таковым при исследовании нАГ.

Проведённое исследование экспрессии ингибирующего апоптоз белкового фактора bcl-2 в раннем периоде при введении нПВТ100 и нПВТ500 выявило

статистически значимые изменения в содержании всех типов клеток лишь по отношению к группам контроля и КС (Рисунок 4.9, 4.10, Таблица 4.4).

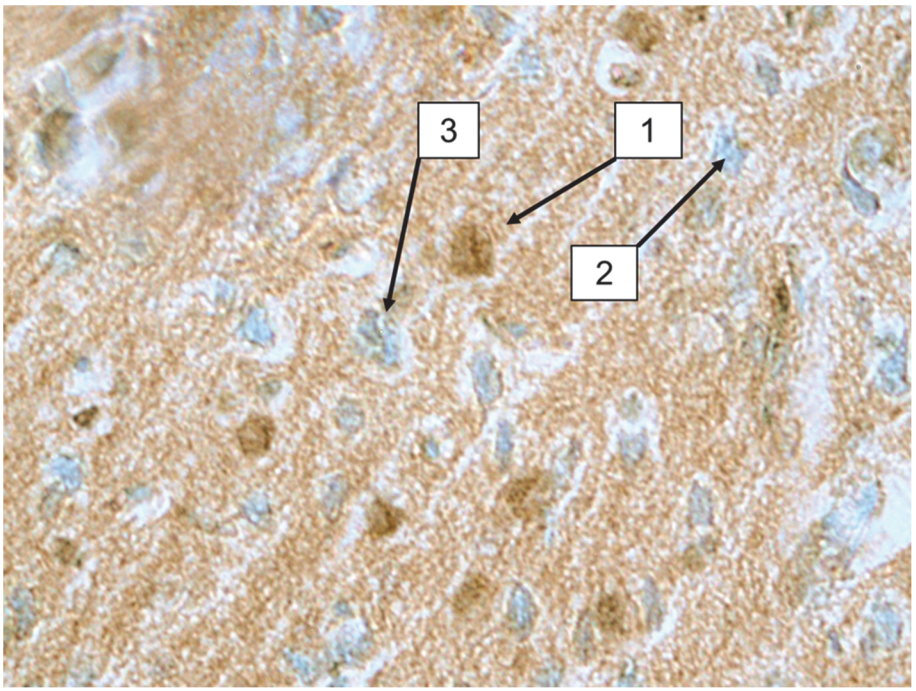

Рисунок 4.9 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка bcl-2 в группе нПВТ100 (ранний период обследования): 1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки; 3 – тёмные нейроны. Ув. ×400

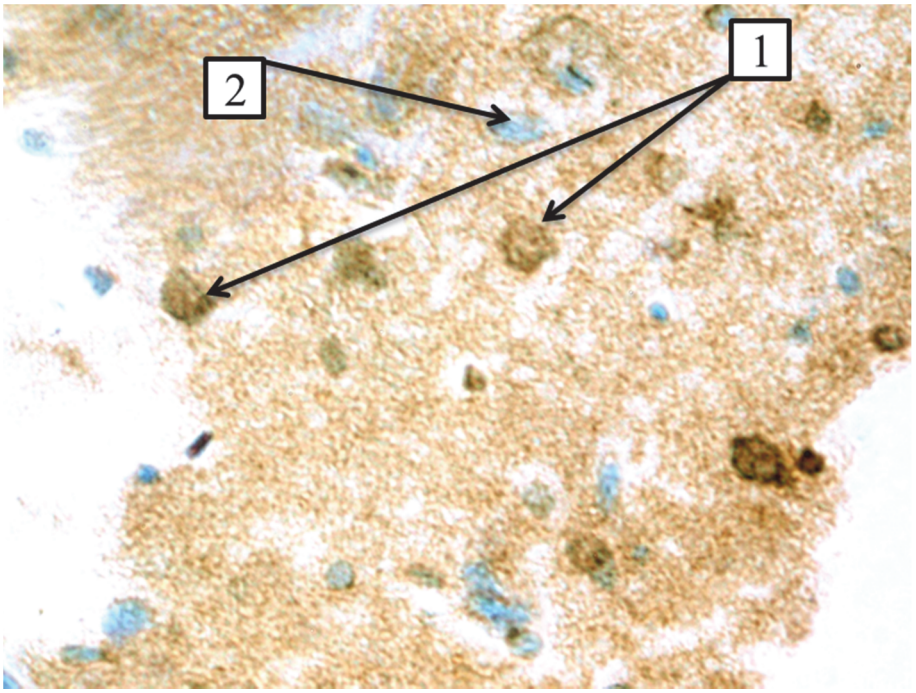

Рисунок 4.10 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка bcl-2 в группе нПВТ500 (ранний период обследования): 1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки. Ув. ×400

По сравнению с аналогичными значениями, полученными при введении матрицы ПВТ, различий не выявлено. Говоря другими словами, изменения в экспрессии белка bcl-2 при введении нПВТ в обеих дозах и «чистого» ПВТ между собой статистически значимо не отличались. Выявленные изменения экспрессии регуляторного белка апоптоза bcl-2 обусловлены преимущественно матрицей – синтетическим полимером – и могут рассматриваться как проявления стандартного биологического ответа организма на введение чужеродного вещества.

Таблица 4.4 – Экспрессия белка bcl-2 при воздействии ПВТ, нПВТ100 и нПВТ500 в раннем периоде обследования, % от общего количества клеток в 0,2 мм^2 (Me (Q_{25}–Q_{75}); n = 10)

Группы	**Тёмные клетки**	**Нормальные иммунопозитивные клетки**	**Нормальные иммунонегативные клетки**
Контроль	2,01 (1,86–2,19)	2,07 (1,55–2,19)	95,92 (94,99–97,33)
КС	1,59 (1,45–1,79)	1,52 (1,22–1,84)	96,89 (96,43–97,06)
ПВТ	4,06 (3,13–5,03)*; #	4,19 (2,79–4,46)#	91,75 (90,45–93,52)*; #
нПВТ100	4,00 (3,75–4,57)*; #	4,66 (3,89–5,36)*; #	91,34 (90,34–91,85)*; #
нПВТ500	3,92 (2,52–4,32)*; #	3,58 (2,85–4,32)*; #	92,50 (91,67–93,25)*; #

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0,01$ * – по сравнению с группой контроля, # – по сравнению с группой КС. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна – Уитни

В отдалённом сроке обследования наблюдалась схожая картина. Несмотря на численное повышение процентного содержания, данные изменения статистически различались лишь по отношению к группе контроля или КС (Рисунок 4.11, 4.12, Таблица 4.5). На основании данного факта можно заключить, что свидетельства индукции апоптоза в клетках при воздействии нанокомпозита в высокой дозе отсутствуют и, соответственно, дозовая зависимость не выявляется.

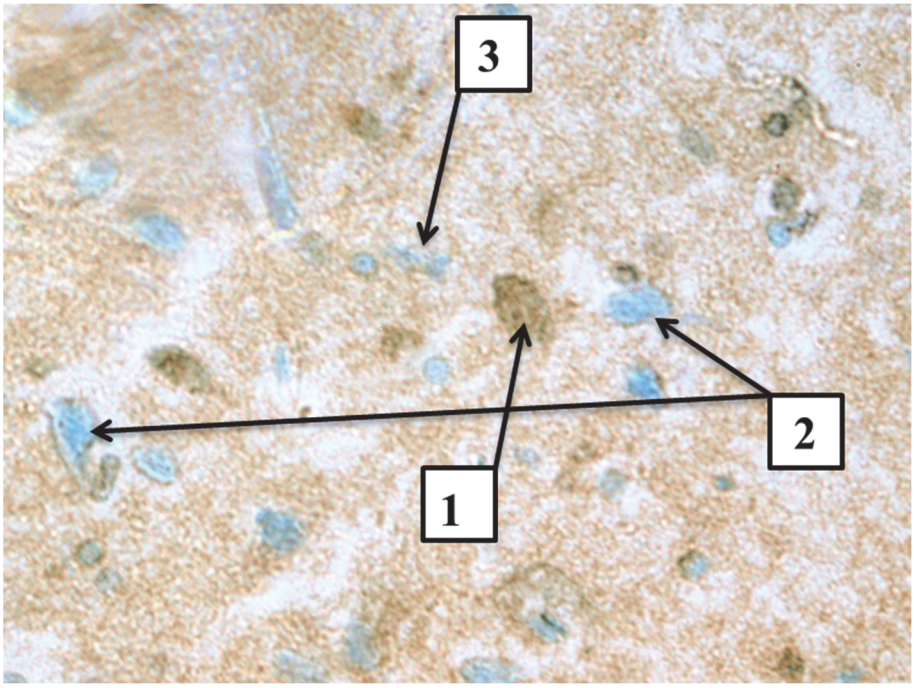

Рисунок 4.11 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка bcl-2 в группе нПВТ100 (отдалённый период обследования):
1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки; 3 – тёмные нейроны. Ув. ×400

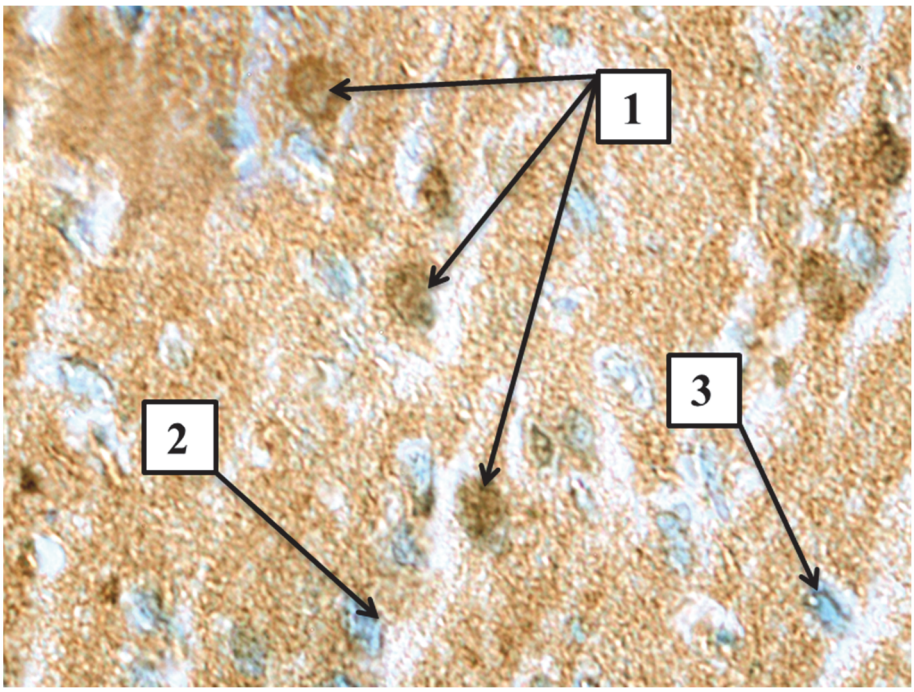

Рисунок 4.12 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка bcl-2 в группе нПВТ500 (отдалённый период обследования):
1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки; 3 – тёмные нейроны. Ув. ×400

Таблица 4.5 – Экспрессия белка bcl-2 при воздействии ПВТ, нПВТ100 и нПВТ500 в отдалённом периоде обследования, % от общего количества клеток в 0,2 мм^2 (Me (Q_{25}–Q_{75}); n = 10)

Группы	**Тёмные клетки**	**Нормальные иммунопозитивные клетки**	**Нормальные иммунонегативные клетки**
Контроль	3,14 (2,07–4,91)	1,42 (1,12–1,95)	95,44 (93,26–95,61)
КС	2,76 (2,18–3,50)	1,38 (1,16–2,21)	95,86 (94,69–96,14)
ПВТ	3,90 (3,10–7,39)	4,46 (4,21–5,10)*; #	91,64 (88,28–93,08)*; #
нПВТ100	3,66 (2,55–5,03)#	4,90 (3,79–6,50)*; #	91,44 (87,58–93,43)*; #
нПВТ500	3,20 (1,92–3,73)	4,63 (3,13–5,01)	92,17 (90,66–93,65)

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0,01$ * – по сравнению с группой контроля, # – по сравнению с группой КС. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна – Уитни

При исследовании активности белка caspase-3 в раннем сроке обследования при введении двух доз нанобиокомпозита были получены аналогичные результаты: количество тёмных и нормальных клеток с экспрессией caspase-3 при введении нПВТ статистически значимо не отличалось от таковых при введении чистого ПВТ (Таблица 4.6, Рисунок 4.13, 4.14).

Таблица 4.6 – Экспрессия белка caspase-3 при воздействии ПВТ, нПВТ100 и нПВТ500 в раннем периоде обследования, % от общего количества клеток в 0,2 мм^2 (Me (Q_{25}–Q_{75}); n = 10)

Группы	**Тёмные клетки**	**Нормальные иммунопозитивные клетки**	**Нормальные иммунонегативные клетки**
Контроль	2,56 (1,79–2,74)	1,93 (1,77–2,09)	95,51 (94,61–95,67)
КС	1,91 (1,62–2,49)	1,67 (1,14–2,49)	96,42 (95,15–96,76)
ПВТ	3,97 (3,03–4,10)	3,93 (3,42–4,36)*; #	92,10 (90,00–93,90)*; #
нПВТ100	3,89 (3,55–4,97)*; #	4,24 (2,61–15,00)	91,87 (83,85–93,06)*; #
нПВТ500	3,02 (2,32–4,41)	3,93 (3,29–4,52)#	93,05 (91,46–94,59)*; #

Примечания: различия статистически значимы при $p < 0,01$ * – по сравнению с группой контроля, # – по сравнению с группой КС. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна – Уитни

Подобная картина свидетельствовала о том, что введение наносеребра, инкапсулированного в поливинилтриазол, не изменяет экспрессию белка-индуктора

апоптоза. В данном случае отсутствует чёткая зависимость между показателями, выявляемыми при введении матрицы ПВТ и нанокомпозита на его основе.

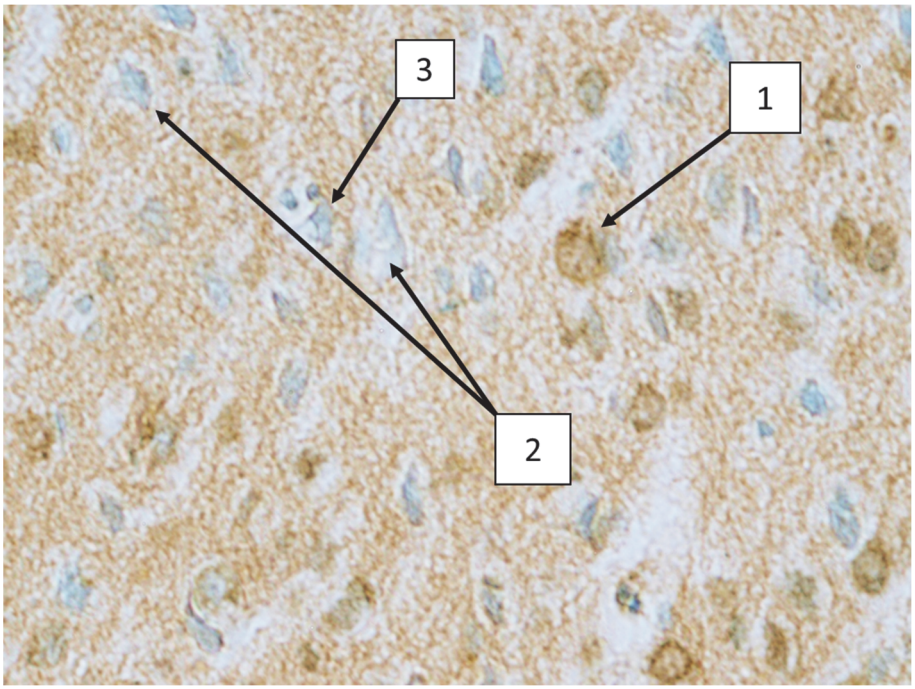

Рисунок 4.13 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка caspase-3 в группе нПВТ100 (ранний период обследования):
1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки; 3 – тёмные нейроны. Ув. ×400

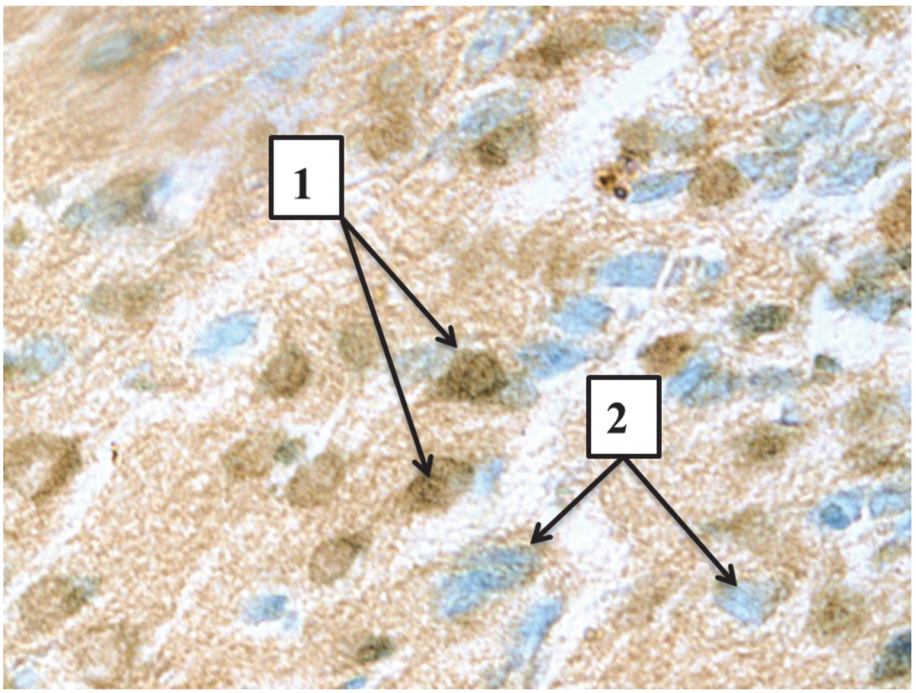

Рисунок 4.14 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка caspase-3 в группе нПВТ500 (ранний период обследования):
1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки; 3 – тёмные нейроны. Ув. ×400

При обследовании в отдалённом периоде в опытных группах наблюдались разнонаправленные результаты: в группе нПВТ100 наблюдалось незначительное понижение показателей, в группе нПВТ500 – наоборот, незначительное повышение (Таблица 4.7, Рисунок 4.15, 4.16). При этом статистически значимых различий, по сравнению с группой ПВТ, не наблюдалось.

Таблица 4.7 – Экспрессия белка caspase-3 при воздействии ПВТ, нПВТ100 и нПВТ500 в отдалённом периоде обследования, % от общего количества клеток в 0,2 мм^2 (Me (Q_{25}–Q_{75}); n = 10)

Группы	**Тёмные клетки**	**Нормальные иммунопозитивные клетки**	**Нормальные иммунонегативные клетки**
Контроль	2,60 (2,17–3,52)	1,45 (0,89–1,74)	95,95 (94,93–96,75)
КС	2,29 (1,75–2,64)	2,25 (1,74–2,67)	95,46 (05,04–96,53)
ПВТ	2,49 (1,90–6,14)*; #	2,46 (2,02–4,36)*; #	95,05 (93,56–98,97)*; #
нПВТ100	2,30 (2,02–3,14)	2,41 (2,00–2,99)	95,29 (93,48–95,88)
нПВТ500	2,79 (2,19–3,13)	2,80 (2,35–3,30)*; #	94,41 (93,20–95,36)*; #

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0,01$ * – по сравнению с группой контроля, # – по сравнению с группой КС. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна – Уитни

Полученные результаты свидетельствуют о том, что биологический эффект от воздействия на животных изучаемого нанобиокомпозита приближался к ответной реакции группы контроля. Статистически значимых различий с группой ПВТ не наблюдалось, поэтому динамическое исследование не проводилось. Наблюдаемые изменения не могут быть оценены как развитие апоптотического процесса в отдалённом периоде воздействия нПВТ.

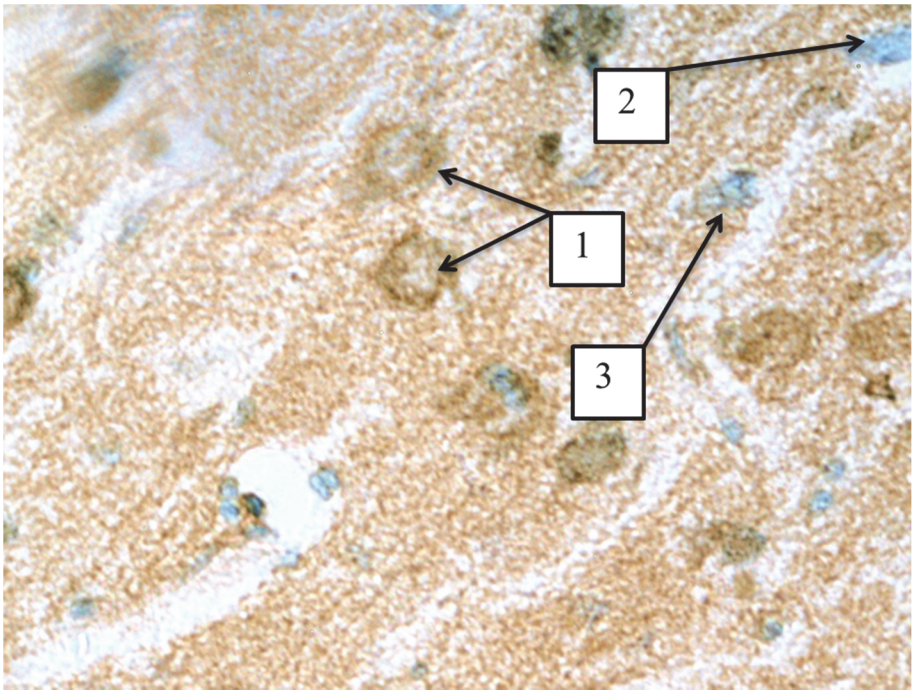

Рисунок 4.15 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка caspase-3 в группе нПВТ100 (отдалённый период обследования):
1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки; 3 – тёмные нейроны. Ув. ×400

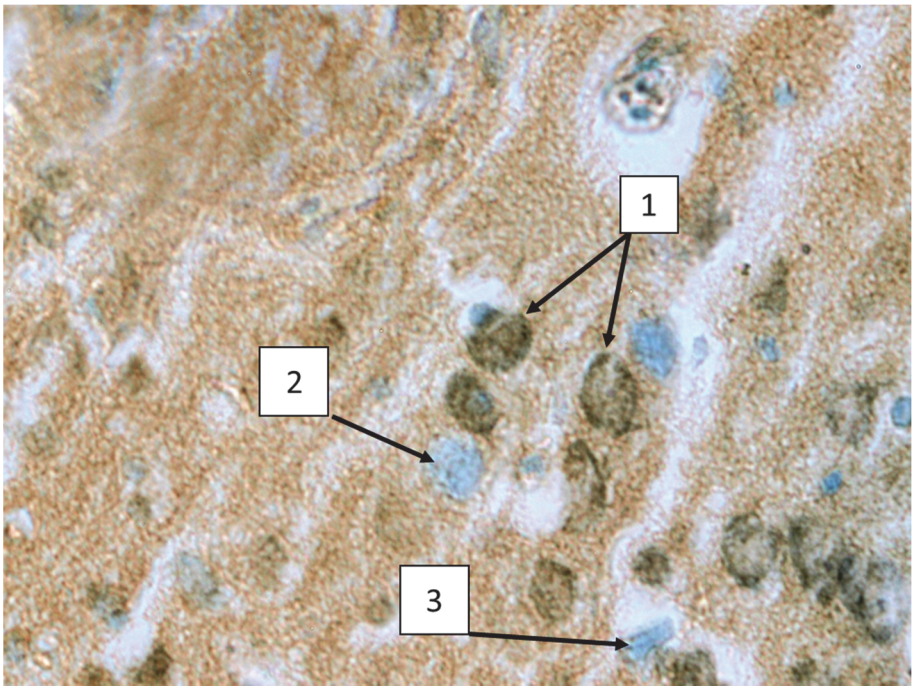

Рисунок 4.16 – Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии белка caspase-3 в группе нПВТ500 (отдалённый период обследования):
1 – нормальные иммунопозитивные клетки; 2 – нормальные иммунонегативные клетки; 3 – тёмные нейроны. Ув. ×400

4.7. Дискриминантный анализ показателей экспрессии белков при введении аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола

При использовании многофакторного дискриминантного анализа из 12 признаков, описывающих биологический ответ клеток головного мозга, были выявлены 3 наиболее информативных показателя, различающих процентное содержание клеток нервной ткани, экспрессирующих белки bcl-2 и caspase-3, раннем и отдалённом периодах обследования. В таблице 4.8 представлены значения критерия Фишера с соответствующими уровнями значимости переменных.

Таблица 4.8 – Показатели информативности признаков, включённых в канонические дискриминантные функции для групп контроля, КС, ПВТ, нПВТ100, нПВТ500

№	Показатели	Критерий Фишера	*p*
a_1	Процентное содержание нормальных клеток с экспрессией bcl-2 в отдалённом периоде обследования	18,34752	< 0,0001
a_2	Процентное содержание тёмных клеток с экспрессией caspase-3 в раннем периоде обследования	17,79697	< 0,0001
a_3	Процентное содержание нормальных клеток без экспрессии caspase-3 в раннем периоде обследования	5,070566	< 0,01

Канонические линейные дискриминантные функции K_1 и K_3 (корень 1 и корень 3) имели следующий вид:

$$\boldsymbol{K_1 = 0{,}73 + 0{,}83 \times a_1 + 0{,}18 \times a_2 + 0{,}51 \times a_3;}$$

$$\boldsymbol{K_3 = 0{,}95 + 0{,}39 \times a_1 + 1{,}02 \times a_2 - 0{,}05 \times a_3,}$$

где K_1 и K_3 – значения канонической дискриминантной функции; 0,73 и 0,95 – константы; $a_{1,\,2,\,3}$ – числовые значения показателей проведённого обследования; 0,83, 0,18, …, 0,05 – коэффициенты, вычисленные с помощью дискриминантного анализа.

При проверке разбивки показателей процентного содержания точность группирования составила 97,87 %.

Кроме расчёта канонических линейных дискриминантных функций, построен график положения объектов пяти групп в координатах первой и третьей

канонических дискриминантных функций (они имеют наиболее высокую степень значимости ($p < 0{,}0001$)). Средние значения канонических величин для каждой группы в корне 1 и корне 3 представлены в таблице 4.9.

Таблица 4.9 – Средние значения канонических величин для групп контроля, КС, ПВТ, нПВТ100 и нПВТ500 (корень 1 и корень 3)

Группа	**Корень 1**	**Корень 3**
Контроль	2,4	0,007
КС	3,0	–0,4
ПВТ	–2,2	2,6
нПВТ100	–3,8	–1,9
нПВТ500	0,9	–0,3

На рисунке 4.17 представлено графическое изображение на плоскости центроидов канонических величин групп: контроль, КС, ПВТ, нПВТ100, нПВТ500, по которому проанализировано относительное расположение групп в признаковом пространстве и выявлены наиболее удалённые и близко расположенные группы.

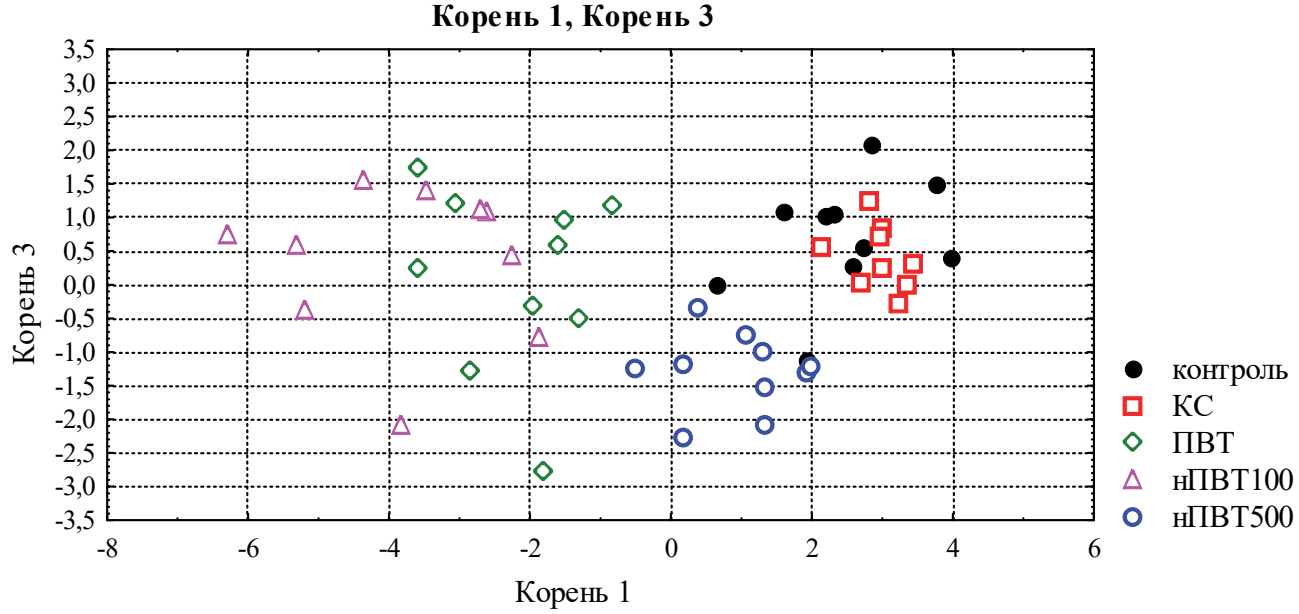

Рисунок 4.17 – Распределение групп контроля, КС, ПВТ, нПВТ100 и нПВТ500 по показателям процентного содержания клеток

Как видно из рисунка 4.17, ни одна каноническая дискриминантная функция не вносит существенный вклад в дискриминацию между группами

В корне 1 (горизонтальная ось) наблюдалась смешанная картина. Значения групп ПВТ и нПВТ100 близки друг к другу и располагались в отрицательной зоне с координатами, соответственно, –2,2 и –3,8. Значения данных групп имели высокую степень дискриминации по отношению к группе контроля и группе КС. Значения групп КС и контроля расположены в положительной зоне, с координатами, соответственно, 2,4 и 3,0. Значения группы нПВТ500 расположены в обеих зонах, о чем свидетельствовала координата её центральной точки (0,9). При этом в исследуемых группах не наблюдалось такой высокой степени дискриминации, которая выявлялась в группах нАГ100 и нАГ500.

В корне 3 (вертикальная ось) также не наблюдалось высокой степени дискриминации, значения групп ПВТ и нПВТ100 расположены в положительной и отрицательной зонах с координатами, соответственно, 2,6 и –1,9. Единственной группой, значения которой располагались исключительно в отрицательной зоне, была группа нПВТ500 (–0,3) Значения остальных групп находились в околонулевой зоне, координаты их центральных точек подтверждали данную локацию (0,07 в группе контроля, –0,4 в группе КС).

Расстояние Махаланобиса между групповыми центроидами группы контроля, ПВТ и нПВТ100 расстояние составляет 31,6 ($F = 26{,}06$; $p < 0{,}0001$) и 47,5 ($F = 38{,}89$; $p < 0{,}0001$) соответственно. Между группами нПВТ100 и нПВТ500 расстояние Махаланобиса составляло 30,7 ($F = 25{,}15$; $p < 0{,}001$).

Таким образом, дискриминантный анализ ответной реакции клеток, экспрессирующих про- и антиапоптотические белки, при воздействии наносеребра на матрице ПВТ не позволил выделить какую-либо группу животных, отличающуюся по дифференцирующим признакам.

Сравнение результатов дискриминантного анализа позволило в полной мере определить влияние наночастиц серебра на экспрессию про- и антиапоптотических белков caspase-3 и bcl-2 при введении их на матрице АГ и ПВТ. Установлено, что наиболее отличающимися по дифференцирующим

признакам, характеризующим процентное содержание клеток с или без экспрессии того или иного белка, являлись группы нАГ100 и нАГ500, в то время как при воздействии нПВТ100, нПВТ500 и ПВТ не выявлены выраженные отличия по дифференцирующим признакам.

Таким образом, результаты исследования свидетельствовали о низкой степени воздействия нанокомпозита на матрице ПВТ в различных дозировках на организм. В тканях наблюдались лишь незначительные структурные изменения, которые можно связать с ответом организма на введение чужеродного агента. Результаты определения среднесмертельной дозы позволили отнести его к IV классу (малоопасное вещество). 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. В силу замкнутой химической структуры наносеребро не выделяется из полимерной матрицы и не принимает участия в реакциях клеточного метаболизма. Исследования экспрессии белков не выявили каких-либо изменений, свидетельствующих об активации апоптоза в нервных клетках при воздействии нанобиокомпозита, по сравнению с синтетической полимерной матрицей. Сравнительный анализ между изучаемыми результатами в группах животных, получивших чистый ПВТ, нПВТ100 и нПВТ500, не выявил повышения 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.

ГЛАВА 5. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ НАНОБИОКОМПОЗИТОВ

Для сравнительной оценки воздействия инновационных медицинских нанобиополимеров с инкапсулированными наночастицами серебра было сформировано 8 групп белых крыс, которым перорально вводили на протяжении 9 дней водный раствор наночастиц серебра, инкапсулированных в природную биополимерную (арабиногалактан) и синтетическую (поли-1-винил-1,2,4-триазол) матрицы, в равных дозах из расчёта 100 или 500 мкг серебра на 1 кг массы. Животные групп сравнения получали только водный раствор соответствующего полимера или водную дисперсию коллоидного серебра, стабилизированного казеином, с содержанием серебра 8 %, или дистиллированную воду в эквивалентных дозах. Обследование выполняли сразу и спустя 6 месяцев (соответствует 18 годам жизни человека) после окончания экспозиции, для выявления отдалённых эффектов нейроинтоксикации и связанных с ней нарушений головного мозга на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях.

Проведённое морфологическое исследование при введении животным доз исследуемого нанобиокомпозита нАГ (100 и 500 мкг серебра на 1 кг массы тела) свидетельствовало о нарушениях структуры нервной ткани. Так, при введении нанобиокомпозита на основе АГ в обеих дозах наблюдались расширение периваскулярных пространств, набухание проводящих пучков, нейронофагия, набухание миоцитов и эндотелиоцитов сосудов, наличие тёмных нейронов. Исследование структуры головного мозга животных при введении им «чистого» природного полимера АГ выявило лишь расширение периваскулярных пространств, а также нейронофагию, т. е. изменения, обычно сопровождающие метаболические сдвиги в структуре клеток и тканей. Вероятно, это связано с развитием компенсаторно-приспособительных реакций, возникающих в ответ на проникновение чужеродного агента через гемато-энцефалический барьер, и характерно для перестройки функционального состояния организма на новый

устойчивый уровень. По результатам электронно-микроскопического исследования выявлена в раннем сроке обследования и сохранялась в динамике при воздействии обеих доз нАГ деформация ядра. Также наблюдалось статистически значимое как по отношению к контролю, так и по отношению к «чистому» АГ увеличение площади митохондрий. Мы считаем, что это связано с активацией митохондриальной стадии апоптоза, сопровождающейся дизрегуляцией цикла Кребса, нехваткой энергии для нормального функционирования клетки, что приводит к гибели последней и образованию апоптотических телец. Ультраструктурный анализ ядер нейронов с выявленной неправильной деформированной формой и увеличение площади митохондрий свидетельствуют о неблагоприятном воздействии наночастиц серебра на внутриклеточные структуры и являются косвенными подтверждениями способности наносеребра проникать из полимерной матрицы в головной мозг. При исследовании элементного состава образцов тканей головного мозга животных, экспонированных нАГ, в отдалённом периоде обследования были обнаружены наночастицы серебра, что свидетельствует о том, что природный полимер арабиногалактан способен доставлять наносеребро в головной мозг, проникая через гемато-энцефалический барьер.

В сравнении с выявленными изменениями структуры нервной ткани при воздействии нАГ, морфологическое исследование препаратов животных, получивших нПВТ, показало лишь незначительное набухание проводящих волокон животных в раннем периоде обследования. В случае поступления в организм «чистого» синтетического полимера поли-1-винил-1,2,4-триазол наблюдались лишь единичные изменения, не имевшие множественного подтверждения, а морфофункциональное состояние нервной ткани в данном случае, как и при введении животным КС, было сопоставимо с результатами, полученными в группе контроля.

Учитывая неоднозначные сообщения о влиянии наночастиц металлов и, в частности, серебра на внутриклеточные процессы апоптоза [Simkó M., Mattsson M., 2010; Powers C. M. et al., 2011b], было проведено исследование

соотношения про- и противоапоптотических белков caspase-3 и bcl-2 в нейронах коры головного мозга белых крыс при пероральном введении изучаемых нанобиокомпозитов. Преобладание выработки того или иного типа белков способствует либо индукции апоптоза, либо мобилизации защитных механизмов и восстановлению функционального состояния клетки.

Учитывая малый размер наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерные матрицы, нами было высказано предположение о том, что в случае проникновения наночастиц серебра через гемато-энцефалический барьер в нейронах возможно развитие процесса апоптоза. Большинство форм апоптоза у позвоночных реализуется по митохондриальному пути, а не через рецепторы клеточной гибели [Григорьев М. Ю., Имянитов Е. Н., Хансон К. П., 2003; Нагорнев В. А., Восканьянц А. Н., 2003]. Митохондриальный сигнальный путь апоптоза реализуется в результате выхода апоптогенных белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки. Высвобождение апоптогенных белков, предположительно, может осуществляться двумя путями: за счёт разрыва митохондриальной мембраны или же путём открытия высокопроницаемых каналов на внешней мембране митохондрий. Ключевым событием митохондриального пути апоптоза является повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий. При повышении проницаемости из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль высвобождаются растворимые белки, участвующие в апоптозе, в том числе белок caspase-3. В дальнейшем происходит запуск каспазного каскада: сложно переплетённые цепочки взаимодействий инициирующих и эффекторных каспаз. В процессе регуляции апоптоза в дело вступают антиапоптотические белки bcl-2, содержащие 4 BH-домена. В итоге достигается комбинированная регуляция проницаемости наружной мембраны митохондрий и, соответственно, процесса апоптоза за счёт взаимодействия апоптотических, антиапоптотических белков.

Анализ активности регуляторных белков в нейронах при воздействии инновационных нанобиокомпозитов свидетельствовал об увеличении экспрессии в нейронах анти- и проапоптотических белков только в случае введения

животным нанокомпозита на матрице АГ. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белкового фактора bcl-2, одной из функций которого, как известно, является предотвращение запуска процесса апоптоза, показало, что при введении чистого АГ и нАГ100 наблюдались статистически значимые, по сравнению с группами контроля и КС, изменения процентного содержания всех типов исследуемых клеток по отношению к их общему количеству на площади в 0,2 мм^2. Вместе с тем при введении нАГ500 выявлялось статистически значимое как по сравнению с контролем, так и по сравнению с АГ, увеличение процентного содержания тёмных клеток с одновременным снижением содержания нормальных иммунонегативных клеток, что может быть связано с активацией экспрессии изучаемого белкового фактора. В препаратах выявлялось значимое возрастание количества нормальных нейронов, экспрессирующих белок bcl-2, однако протективное действие данного белка не реализовалось в полной мере. При обследовании через 6 месяцев выявленная направленность изменений сохранялась, при этом значительно чаще, по сравнению с группами контроля и 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 мг/кг.

При исследовании экспрессии эффекторного белка caspase-3, который активирует процесс апоптоза, при воздействии нАГ выявлено статистически значимое, по отношению к группе АГ, изменение содержания практически всех типов исследуемых клеток. Наблюдалось сокращение на единицу площади количества нормальных неизменённых клеток без экспрессии проапоптотического белка caspase-3, в то время как количество тёмных нейронов и нормальных клеток, экспрессирующих белок caspase-3, повысилось. Выявленные результаты свидетельствуют об активации апоптотических процессов уже на 10-й день после воздействия нанобиокомпозита. 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 отдалённом периоде обследования количество тёмных нейронов и нормальных клеток, экспрессирующих белок caspase-3, становится ещё выше, что свидетельствует о нарастании с течением времени процесса апоптоза при воздействии нанобиокомпозита на природной матрице арабиногалактан. Появление отдалённых эффектов действия при введении крысам нанобиокомпозита серебра 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. При этом длительное нахождение и незначительная элиминация наночастиц серебра из организма, вполне вероятно, способствуют формированию накопленных неблагоприятных эффектов.

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-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 нейронов, можно заключить, что гибель клеток идёт как с запуском программы апоптоза, так и в связи с 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. В норме внутренние мембраны митохондрий непроницаемы для ионов, за исключением Ca^{2+} и, возможно, ионов железа. Поэтому пассивное набухание митохондрий происходит только при воздействиях, которые увеличивают проницаемость

мембран митохондрий одновременно для катионов и анионов (например, для K^+ и Cl^-). К таким агентам относятся ионы тяжёлых металлов (ртуть, серебро, свинец). Большую роль в патологии клетки играет также повреждение ионтранспортирующих ферментов (например, Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТФазы), в активный центр которых входят тиоловые группы. Тиоловые группы, образующие при окислении дисульфидные мостики — S — S —, скрепляют макроструктуру белковой частицы, придают ей оптимальную конфигурацию и тем самым опосредованно обеспечивают функционирование активного центра. Установлено, что ионы серебра, аналогично ртути, ускоряют гидролитическое расщепление S–S-связей в щелочной среде [Онищенко Г. Г., 2010]. Начальная скорость реакции гидролиза пропорциональна концентрации ионов серебра, т. е. роль ионов металла не сводится лишь к сдвигу равновесия в гидролитическом расщеплении связи, а ион металла присоединяется к связи с образованием комплекса, который затем гидролизуется под влиянием нуклеофильной атаки гидроксильных ионов [Powers C. M. et al., 2011b]. Инактивация Ca^{2+}-АТФазы приводит к замедлению откачивания из клетки ионов кальция и ускорению их «протечки» в клетку (где их концентрация меньше). Это вызывает рост уровня ионов кальция в цитоплазме и приводит к появлению дефектов в мембранах клеток и митохондрий. Под действием электрического поля через такие дефекты в клетки входят ионы натрия, а в митохондрии – ионы калия. В результате происходит увеличение осмотического давления внутри клеток и митохондрий и их набухание. Это приводит к ещё большему повреждению мембранных структур. Набухание приводит сначала к разрывам наружных мембран митохондрий, а затем – к их полному разрушению. При нарушении мембранного потенциала митохондрий за счёт повышения их проницаемости происходит высвобождение цитохрома С, который активирует caspase-3. caspase-3 является одним из конечных пунктов каскада активации протеолитических ферментов, приводящих к программированной смерти клетки. 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. В дальнейшем снижение количества нейронов на единицу площади может приводить к замещению их глиальными клетками с развитием глиоза и формированию нейродегенеративного процесса. Аналогичного мнения придерживаются исследователи из Оренбурга, изучавшие действие на организм белых крыс наночастиц меди, воздействие которых вызывало значительное усилении экспрессии белка caspase-3 в микроглиоцитах коры головного мозга уже через 7 суток после однократного внутримышечного введения в дозе 2 мг/кг массы животного, однако уже через 2 недели этот показатель не отличался от контрольных значений [Сизова Е. А. и др., 2013].

Анализ нарушений структурной организации нейронов и изменений активности экспрессии регуляторных белков позволяет утверждать, что полимерная матрица на основе природного биополимера арабиногалактан обладает способностью проникать через гемато-энцефалический барьер, 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 при помощи просвечивающего микроскопа. Вышеуказанное свидетельствует о том, что полимерная матрица на основе природного биополимера арабиногалактан является перспективным соединением в качестве контейнера для адресной доставки лекарственных и диагностических препаратов в нервную ткань головного мозга.

Анализ результатов экспрессии белков при введении белым крысам нПВТ не выявил каких-либо изменений, свидетельствующих об активации апоптоза в нервных клетках на протяжении всего периода наблюдений. Изменения показателей носили разнонаправленный характер, повышение содержания белка bcl-2, эффективно участвующего в регуляции процесса апоптоза, равно как и повышение экспрессии белка caspase-3, свидетельствующее о необратимых изменениях в клетках при индукции апоптоза, статистически значимо не

отличались от результатов, полученных при введении матрицы ПВТ. Регистрируемые изменения в количествах всех типов изучаемых клеток были значимы лишь при сравнении с данными группы контроля. Полученный результат позволил нам сделать вывод о незначительном воздействии нанобиокомпозита, содержащего наносеребро в синтетической матрице поли-1-винил-1,2,4-триазол, в дозировках 100 и 500 мг/кг на организм, обусловленном в основном матрицей – синтетическим полимером. Выявленные изменения в морфофункциональной организации нейронов можно объяснить стандартным ответом организма на введение чужеродного вещества. По нашему мнению, ПВТ и его производные, благодаря особенностям химического строения (отсутствие открытых химических связей, общая химическая устойчивость), не распадается на отдельные компоненты и не встраивается в цепь биологических реакций в организме и выводится в практически неизменном виде. В силу замкнутой химической структуры наносеребро не выделяется из полимерной матрицы и не принимает участия в реакциях клеточного метаболизма, в отличие от АГ.

Сравнительная оценка результатов проведённого экспериментального моделирования на животных биологических эффектов инновационных полимерных нанобиокомпозитов, содержащих наносеребро в природной (арабиногалактан) и синтетической (поли-1-винил-1,2,4-триазол) матрицах, позволила выявить особенности нарушения клеточной и внутриклеточной организации нейронов. Дальнейшее использование многофакторного дискриминантного анализа дало возможность определить наиболее информативные показатели, различающие морфофункциональное состояние нервной ткани в изучаемых группах. С помощью графического изображения на плоскости центроидов канонических величин групп нАГ100, нАГ500, АГ, КС и контроля, по которому проанализировано относительное расположение групп в признаковом пространстве, выявлены наиболее удалённые и близко расположенные группы. Установлено, что наиболее отличающимся по дифференцирующим признакам, характеризующим процентное содержание клеток с или без экспрессии того или иного белка, являлись группа нАГ100 и

нАГ500. Группа контроля, АГ и КС дискриминированы между собой не столь отчётливо, имея небольшое поле перекрытия, в то время как при воздействии нПВТ100, нПВТ500 и ПВТ не выявлены выраженные отличия по дифференцирующим признакам. Группы нПВТ100 и ПВТ не дискриминированы между собой и имели значительное поле перекрытия.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ПО ИЗУЧЕНИЮ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ НАНОБИОКОМПОЗИТОВ

Бурное развитие нанотехнологий сопровождается повышением уровня воздействия наночастиц на биообъекты, при этом информации об их потенциальной опасности для здоровья недостаточно. Оценка потенциального риска наночастиц для здоровья человека должна базироваться на междисциплинарном подходе, иметь государственные рычаги управления. Традиционные подходы для оценки токсичности химических веществ недостаточны для изучения веществ в нанофазе, так как размер частиц и площадь поверхности могут иметь особое значение. При этом концентрация массы может быть не самым лучшим измерением для описания зависимости доза – эффект. Большую проблему представляет нехватка соответствующих образцов и стандартов для проведения токсикологического тестирования наноматериалов. Недостаточно разработаны методы выявления, идентификации и количественного определения наночастиц в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и биосредах. В Российской Федерации ситуация постепенно улучшается: на данный момент подготовлено и принято более пятидесяти нормативно-правовых актов, касающихся способов отбора, оценки, контроля, выявления и идентификации различных наноматериалов, а также разработаны гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды. Вместе с тем в большинстве документов методология изучения биологических свойств наночастиц основана на принципах классической токсикологии с определением стандартных параметров токсикометрии (LD_{50}, CL_{50}, Lim_{ac} и т. п.). При этом учитывается зависимость «доза – эффект критических систем» или «доза – статус организма» [Оценка безопасности наноматериалов, 2007]. Однако, по данным литературы, не всегда нанопрепарат, являющийся по результатам определения среднесмертельной дозы нетоксичным, оказывается безопасным для организма [Elavazhagan T., Arunachalam K. D., 2011]. Методические подходы,

применяемые в настоящее время для токсико-гигиенической характеристики наноматериалов, на наш взгляд, нуждаются в дополнении и корректировке. Необходимо проведение более узкоспециализированных исследований на клеточном и субклеточном уровнях. Оценка эффекта действия наночастиц и наноматериалов на организм должна выполняться на основании результатов ультрамикроскопических исследований клеток-мишеней (электронно-микроскопическая, конфокальная микроскопия, внутриклеточная протеомика, метаболомика с использованием различных меток) и в течение длительного периода наблюдений. В данной ситуации могут возникать и выявляться морфофункциональные клеточные и субклеточные изменения, которые следует рассматривать как патогенетические факторы, играющие определённую роль в формировании соматической патологии, в том числе и в отдалённые сроки. Изучение уровня потенциальной опасности наноматериалов должно включать полный комплекс исследований по их проникновению через биологические мембраны и барьеры организма, распределению по органам, накоплению в жировой ткани и других органах, выведению из организма. Токсикологическая оценка наночастиц должна не только проводиться с изучением острой, подострой и хронической токсичности, но и включать изучение возможности появления отдалённых эффектов.

В выполненных нами исследованиях при изучении ответной реакции организма экспериментальных животных на введение нАГ установлено повышение активности процессов АОС (SH-глутатиона, каталазы), отсутствие изменений в системе ПОЛ. При изучении среднесмертельной дозы нАГ и нПВТ при внутрижелудочном их введении белым крысам оба нанокомпозита отнесены по параметрам токсикометрии к IV малоопасному классу веществ с LD_{50} при внутрижелудочном введении более 5000 мг/кг массы животного.

Вместе с тем, несмотря на кажущееся благополучие со стороны интегральных показателей организма, при воздействии нАГ выявлены дистрофические нарушения в нейронах, набухание эндотелиоцитов и миоцитов, утолщение стенки сосудов, расширение периваскулярных пространств и

проводящих волокон. Иммуногистохимический анализ свидетельствовал об увеличении экспрессии в нейронах анти- и проапоптотических белков bcl-2 и caspase-3. Наносеребро, инкапсулированное в полимерную матрицу, при подостром введении в организм экспериментальных животных способно индуцировать в нейронах коры головного мозга запуск апоптотического каскада. Статистически значимое увеличение количества нейронов с экспрессией проапоптотического белка, а также гиперхромных нейронов, наряду со снижением числа нормальных, в отдалённом периоде обследования белых крыс свидетельствовало о динамическом нарастании патологического процесса.

Для доказательства проникновения наночастиц серебра в ткань головного мозга белых крыс нами было проведено определение концентрации серебра во внутренних паренхиматозных органах, основанное на атомно-абсорбционном методе анализа с пламенной и электротермической атомизацией, рекомендованном в методических рекомендациях «Оценка безопасности наноматериалов». Полученные результаты свидетельствовали о том, что диапазон измерений содержания серебра данным способом не позволяет объективно оценить уровень наносеребра в органах и биологических средах организма. Использование просвечивающего микроскопа FEI Techni 2G с полевым эмиттером и энергодисперсным детектором позволило идентифицировать наночастицы серебра в ткани мозга.

Методические документы по изучению наночастиц и наноматериалов были разработаны и в странах Евросоюза, США, другими организациями, однако можно наблюдать некоторое отставание методологии европейских документов, по сравнению с отечественными. В зарубежных документах для оценки степени опасности наночастиц и наноматериалов используется меньший объём необходимых токсикологических и медико-биологических исследований. При этом не учитываются физико-химические свойства наночастиц, не рассматривается приоритетность в изучении наночастиц, предназначенных для производства и потребления.

Для изучения особенностей воздействия нанобиополимеров, содержащих наночастицы серебра, на центральную нервную систему и решения вопросов нейровизуализации патологического процесса нами разработан алгоритм по экспериментальному моделированию нейроинтоксикации нанобиокомпозитами, который включал следующие этапы:

1. Подбор лабораторных животных для проведения исследований

Эксперименты выполняются на беспородных белых крысах, при этом каждая группа должна содержать не менее 10–15 особей. Группы животных подбираются в соответствии с методическими рекомендациями «Оценка безопасности наноматериалов», утверждёнными Приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 280 от 12.10.2007, согласно которым, кроме экспонирования препаратами, содержащими наноматериалы, также исследуются препараты, полученные традиционным способом. Группы сравнения внутрижелудочно получают водный раствор биополимера в эквивалентной дозе или водную дисперсию коллоидного серебра, стабилизированного казеином, с содержанием серебра 8 %. Животные контрольной группы для соблюдения сходных условий в том же режиме воздействия получают эквивалентный объём дистиллированной воды.

2. Способы введения и дозы воздействия

Введение нанобиокомпозитов осуществляется внутрижелудочным зондом из расчёта 100 мкг и 500 мкг серебра на 1 кг массы тела в объёме 0,5 мл дистиллированной воды, но не более 500 мкг. Также возможно и парентеральное введение исследуемых веществ.

3. Сроки воздействия и обследования

Срок воздействия исследуемых веществ не должен составлять менее 9 дней. Обследование выполняется сразу и спустя 6 месяцев после окончания экспозиции, для выявления отдалённых эффектов нейроинтоксикации и связанных с ней нарушений головного мозга на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях.

4. Нейровизуализация нарушений в ткани головного мозга белых крыс

Морфологические и иммуногистохимические исследования проводят сразу после окончания воздействия и не менее чем через 6 месяцев после него. Головной мозг от каждого исследуемого животного фиксируют в нейтральном буферном растворе формалина (10 %), обезвоживают этанолом восходящей концентрации (70 %, 80 %, 90 %, 95 % и 100 %) и помещают в гомогенизированную парафиновую среду для гистологических исследований HistoMix (BioVitrum, Россия). Для морфологического исследования используют послойные серийные срезы ткани головного мозга с шагом в 5 микрон: фронтальные срезы от Bregma 1,60 мм до Bregma –14,60 мм, саггитальные – от Lateral 0,40 мм до Lateral 4,60 мм, горизонтальные – от Bregma –3,10 мм, Interaural 6,90 мм до Bregma –9,60 мм, Interaural 0,40 мм. Обследуют сенсомоторную кору головного мозга в височно-теменной доле. Для выполнения обзорной микроскопии препараты окрашивают гематоксилин-эозином, раствором тионина по Нисслю, пикрофуксином по Ван-Гизону.

Для изучения ультраструктуры нервной ткани проводят электронную микроскопию нейронов коры головного мозга с выполнением морфометрии. Для определения активности белков caspase-3 и bcl-2 применяют иммуногистохимический метод. Полученные на микротоме срезы помещают на полизиновые стёкла (Menzel, Германия) и окрашивают на антитела к белку caspase-3 и белку bcl-2 (Monosan, Нидерланды) в соответствии с протоколом, предложенным производителем.

Морфометрические исследования включают обзорную оценку состояния ткани, площадь сечения митохондрий в разные периоды обследования. Исследование препаратов проводят с помощью светооптического исследовательского микроскопа Olympus BX 51. Ввод микроизображений срезов мозга в компьютер выполняют при помощи камеры Olympus E420. Обработку полученных изображений осуществляют с помощью методик, входящих в программный пакет Image Scope M.

Определение наночастиц серебра в нервной ткани осуществляют в динамике наблюдения: сразу после окончания воздействия и в отдалённом периоде наблюдения (через 6 месяцев после введения). Доказательную идентификацию наносеребра в ткани проводят при помощи просвечивающего микроскопа FEI Technai 2G с полевым эмиттером и энергодисперсным детектором.

Научное осмысление полученных результатов экспериментального моделирования из комплекса методов позволило нам на основе анализа процесса апоптоза выбрать наиболее информативные иммуногистохимические критерии токсического поражения головного мозга белых крыс при воздействии нАГ.

Оценивая в динамике экспериментального воздействия на лабораторных животных выраженность процесса апоптоза на примере токсического действия нАГ сразу после окончания воздействия и спустя 6 месяцев после него, в препаратах:

– подсчитывают число патологически изменённых (гиперхромных) нейронов, выявленных при оценке экспрессии белка caspase-3 или bcl-2;

– подсчитывают количество нормальных нейронов с и без экспрессии белков caspase-3 и bcl-2;

– вычисляют соотношение соответствующего количества гиперхромных нейронов к аналогичным показателям на препаратах группы контроля;

– вычисляют соотношение соответствующего количества нормальных нейронов с экспрессией белков caspase-3 и bcl-2 к аналогичным показателям на препаратах группы контроля.

Если в ранний срок обследования наблюдается увеличение числа гиперхромных нейронов, определённых в препаратах при оценке экспрессии белка caspase-3, в среднем в 1,5 раза для группы нАГ100 и в 2,6 раза для группы нАГ500, в сравнении с группой контроля; увеличение числа нормальных нейронов с экспрессией белка caspase-3 в среднем в 2,5 раза для группы нАГ100 и в 2,6 раза для группы нАГ500, в сравнении с группой контроля; увеличение гиперхромных нейронов, определённых в препаратах при оценке экспрессии

белка bcl-2, в среднем в 2,2 раза для группы нАГ100 и в 2,4 раза для группы нАГ500, то это свидетельствует о возникновении и развитии патологического процесса сразу после окончания воздействия нанокомпозита серебра с преобладанием повреждений нейронов по типу апоптоза в ткани головного мозга. В отдалённый период обследования, в сравнении с группой контроля, увеличение числа гиперхромных нейронов, подсчитанных в препаратах при оценке экспрессии белка caspase-3, в среднем в 2,7 раза для группы нАГ100 и в 5,1 раза для группы нАГ500; увеличение числа нормальных нейронов с экспрессией белка caspase-3 в среднем в 2,5 раза для группы нАГ100 и в 2,6 раза для группы нАГ500, наряду с увеличением числа гиперхромных нейронов в препаратах при оценке экспрессии белка bcl-2 в 1,7 раза для группы нАГ100 и в 4,1 раза для группы нАГ500; увеличение числа нормальных нейронов с экспрессией белка bcl-2 в 5,7 раза для группы нАГ100 и в 5,1 раза для группы нАГ500 свидетельствует о развитии и сохранении процесса апоптоза в ткани головного мозга в отдалённом периоде воздействия нанокомпозита серебра, инкапсулированного в полимерную матрицу арабиногалактан.

По нашему мнению, предложенный алгоритм к изучению нейротоксичности нанобиокомпозитов, содержащих серебро, позволит оценить токсичность нанобиокомпозитов, содержащих наночастицы, и других металлов на клеточном и субклеточном уровнях, что позволит более объективно провести анализ биологических эффектов инновационных нанобиополимеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённые нами исследования позволяют высказать утверждение о том, что токсичность наноструктурированных препаратов нельзя 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 классической токсикологии с определением стандартных параметров токсикометрии, не всегда обеспечивает безопасность наноструктурированных препаратов. Развивающаяся при этом ответная реакция основных регулирующих систем чаще всего не 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 АОС (SH-глутатиона, каталазы) и отсутствие изменений в системе ПОЛ. При изучении среднесмертельной дозы нАГ при внутрижелудочном его введении белым крысам нанокомпозит отнесён по параметрам токсикометрии к IV малоопасному классу веществ с LD_{50} при внутрижелудочном введении более 5000 мг/кг. Однако результаты проведённого нами исследования свидетельствуют о наличии токсичности у наночастиц серебра даже при заключении их в матрицу природного полимера из лиственницы сибирской (арабиногалактан), уникальные свойства которого позволяют с лёгкостью преодолевать биологические мембраны организма, что даёт возможность доставлять наночастицы к клеткам организма. Возникающее при внутрижелудочном поступлении нАГ нарушение клеточной и субклеточной организации нейронов следует рассматривать как патогенетический фактор, играющий определённую роль в формировании когнитивных нарушений и астено-вегетативного синдрома, в том числе и в отдалённые сроки. В связи с вышеизложенным относить нанобиокомпозит нАГ к малоопасным веществам представляется по меньшей мере необоснованным и преждевременным.

В связи с этим нами научно обоснован алгоритм по оценке нейротоксичных свойств нанобиокомпозитов, позволяющий, не опираясь на методы классической токсикологии, выявить нарушения на клеточном и внутриклеточном уровнях. Осмысление полученных результатов экспериментального моделирования из комплекса методов позволило нам на основе анализа процесса апоптоза выбрать наиболее информативные иммуногистохимические критерии токсического поражения головного мозга белых крыс при воздействии нАГ.

Технология оценки безопасности нанокомпозитов, 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 отдалённые последствия воздействия.

ВЫВОДЫ

1. Изучаемые нанобиокомпозиты, содержащие наносеребро, конъюгированное как на природной, так и на синтетической полимерной матрице, отнесены по параметрам токсикометрии к IV малоопасному классу веществ с LD_{50} при внутрижелудочном введении более 5000 мг/кг массы животного.

2. Сравнительная оценка в модельных экспериментах на животных биологических эффектов инновационных полимерных нанобиокомпозитов, содержащих наносеребро в природной (арабиногалактан) и синтетической (поли-1-винил-1,2,4-триазол) матрицах, выявила нарушения клеточной и субклеточной организации нейронов, только при введении нанобиокомпозита 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 нанобиокомпозита на природной матрице арабиногалактан. Ранний период воздействия характеризуется расширением периваскулярных пространств, очаговым набуханием проводящих волокон в коре головного мозга, появлением тёмных нейронов, нейронофагией, увеличением площади митохондрий. В отдалённый 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 нанобиокомпозита.

6. В отдалённом периоде обследования при введении наночастиц серебра, инкапсулированных в природную полимерную матрицу арабиногалактан, наблюдается повышение количества нейронов, экспрессирующих белок bcl-2, однако активности последнего недостаточно для предотвращения процесса апоптоза нейронов и формирования внутриклеточных защитных механизмов. При этом количество клеток с индукцией белка 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, в группе нАГ500 – в 4,8 и 6 раз), что характеризует активный апоптотический процесс.

7. Полимерная матрица на основе природного биополимера арабиногалактан 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 нанобиокомпозитов 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 служит базой для биологического скрининга инновационных медицинских нанобиокомпозитов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – арабиногалактан

АОС – антиоксидантная система

ГТГ – глютамилтрансферазы

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДК – диеновый конъюгат

КС – коллоидное серебро

МДА – малоновый диальдегид

нАГ – аргентумарабиногалактан

нПВТ – аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазол

ПВТ – поли-1-винил-1,2,4-триазол

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

BH – домен bcl-2 гомологии (англ. *Bcl-2 Homology Domain*)

LD_{50} – среднесмертельная доза (англ. *Lethal Dose, 50 %*)

BSA – бычий сывороточный альбумин (англ. *Bovine Serum Albumin*)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность наночастиц и наноматериалов для окружающей и производственной среды / А. И. Потапов [и др.] // Гигиена и санитария. – 2013. – № 3. – С. 8–13.

2. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон – М. : Высшая школа, 1991. – 390 с.

3. Владимирская, Е. Б. Механизмы апоптотической смерти клеток / Е. Б. Владимирская // Гематология и трансфузиология. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 35–40.

4. Гайкова, О. Н. Морфологические проявления общепатологических процессов в нервной системе / О. Н. Гайкова. – СПб. : Изд-во «ВЕСЬ», 2015. – 157 с.

5. Гемицеллюлозы и их нанобиокомпозиты – перспективные наноструктурированные синбиотики / Ю. П. Джиоев [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 5 (87). – С. 210–212.

6. Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды ; утв. 25.05.2010. – М., 2010. – 1 с.

7. Глушкова, А. В. Опасность наночастиц и программа превентивных действий / А. В. Глушкова, С. А. Дулов, А. С. Радилов // Токсикологический вестник. – 2010. – № 6. – С. 15–18.

8. Григорьев, М. Ю. Апоптоз в норме и патологии / М. Ю. Григорьев, Е. Н. Имянитов, К. П. Хансон // Медицинский академический журнал. – 2003. – Т. 3, № 3. – С. 3–11.

9. Давидюк, Г. Е. Влияние легирования переходными и редкоземельными металлами на электрические и оптические свойства монокристаллов AgGaGe3Se8 / Г. Е. Давидюк, О. Н. Юрченко, О. В. Парасюк // Неорг. материалы. – 2008. – Т. 44, № 4. – С. 425–430.

10. Дулов, С. А. Методические подходы к оценке сравнительной токсичности наночастиц и наноматериалов на их основе / С. А. Дулов, А. С. Радилов, А. В. Глушкова // 4-й съезд токсикологов России (6–8 нояб. 2013, Москва). – М., 2013. – С. 185–188.

11. Завезенова, И. В. Йогуртный кисломолочный продукт, обогащенный функциональной добавкой арабиногалактан / И. В. Завезенова // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 6. – С. 29–32.

12. Значение программированной гибели клеток (апоптоза) в процессах гистогенеза и цитодифференцировки / А. А. Стадников [и др.] // Вестник ОГУ. – 2007. – № 78. – С. 163–165.

13. Идентификация наночастиц серебра в тканях слизистой оболочки тонкой кишки, печени и селезёнки крыс методом просвечивающей электронной микроскопии / Т. А. Платонова [и др.] // Бюллетень экспериментальной технологии и медицины. – 2013. – Т. 155, № 2. – С. 204–209.

14. Инфракрасные световоды на основе твердых растворов галогенидов серебра / Л. В. Жукова [и др.] // Вест. УГТУ – УПИ. – 2005. – № 5. – С. 219–221.

15. Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии : метод. рекомендации. – М. : Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 79 с.

16. К разработке критериев безопасности наночастиц металлов при введении в организм животных / Е. А. Сизова [и др.] // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2011. – № 1. – С. 40–42.

17. Каркищенко, Н. Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов / Н. Н. Каркищенко // Биомедицина. – 2009. – № 1. – С. 5–27.

18. Каркищенко, Н. Н. Основы биомоделирования / Н. Н. Каркищенко. – М. : Изд-во ВПК, 2004. – 608 с.

19. Контроль наноматериалов в объектах окружающей среды : метод. рекомендации. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011 – 18 с.

20. Контроль наноматериалов, применяемых в сельском хозяйстве : метод. рекомендации. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011 – 9 с.

21. Коржевский, Д. Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов / Д. Э. Коржевский. – СПб. : Кроф, 2005. – 48 с.

22. Косенков, Д. А. Белки теплового шока и апоптоз / Д. А. Косенков, Е. С. Зыкова, А. А. Обухов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2007. – № 2. – С. 52–56.

23. Кристаллы для Ик-техники AgClxBr1-x и AgClxBryI1-x-y и световоды на их основе / Л. В. Жукова [и др.] // Неорг.материалы. – 2008. – Т. 44, № 2. – С. 1516–1521.

24. Лысцов, В. Н. Проблемы безопасности нанотехнологий / В. Н. Лысцов, Н. В. Мурзин. – М. : МИФИ, 2007. – 70 с.

25. Мартынова, Е. А. Регуляция активности каспаз в апоптозе / Е. А. Мартынова // Биоорганическая химия. – 2003. – Т. 29, № 5. – С. 518–543.

26. Мастеров, В. А. Сплавы и биметаллы на его основе / В. А. Мастеров, Ю. В. Саксонов. – М. : Металлургия, 1979. – 296 с.

27. Медведева, Е. Н. Арабиногалактан лиственницы – свойства и перспективы использования (обзор) / Е. Н. Медведева, В. А. Бабкин, Л. А. Остроухова // Химия растительного сырья. – 2003. – № 1. – С. 27–37.

28. Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов : метод. указания. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 123 с.

29. Международные стандарты безопасности при профессиональном воздействии наночастиц и гармонизация гигиенических подходов / А. И. Потапов [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 5. – С. 21–23.

30. Методические аспекты и некоторые принципиальные итоги экспериментального изучения вредного действия на организм металлосодержащих наночастиц и повышение резистентности организма к их

действию / Б. А. Канцельсон [и др.] // 4-й съезд токсикологов России (6–8 нояб. 2013, Москва). – М., 2013. – С. 248–250.

31. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 35 с.

32. Методические указания по проведению санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции, полученной с использованием нанотехнологий и наноматериалов. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 30 с.

33. Методы отбора проб, выявления и определения содержания наночастиц и наноматериалов в составе сельскохозяйственной, пищевой продукции и упаковочных материалов : метод. рекомендации. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 49 с.

34. Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза : метод. указания. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 58 с.

35. Миронов, А. А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине : метод. руководство / А. А. Миронов, Я. Ю. Комиссарчик, В. А. Миронов. – СПб. : Наука, 1994. – 400 с.

36. Митрохин, О. В. Проблемы обращения наноматериалов и работы с нанотехнологиями – пути обеспечения медико-санитарной безопасности наноиндустрии / О. В. Митрохин // Здравоохранение населения и среда обитания. – 2009. – № 2. – С. 4–7.

37. Мнихович, М. В. Оценка апоптоза при раке молочной железы по данным изучения полутонких срезов и электронной микроскопии / М. В. Мнихович // Морфологія. – 2011. – Т. V, № 2. – С. 45–48.

38. Нагорнев, В. А. Апоптоз и его роль в атерогенезе / В. А. Нагорнев, А. Н. Восканьянц // Медицинский академический журнал. – 2003. – Т. 3, № 4. – С. 3–18.

39. Нанокомпозит серебра на основе сульфатированного арабиногалактана, обладающий антимикробной и антитромботической активностью, и способ его получения : Пат. 2462254 Рос. Федерация, МПК A61K 31/737 / Ганенко Т. В., Костыро Я. А., Сухов Б. Г., Трофимов Б. А., Фадеева Т. В., Верещагина С. А., Корякина Л. Б. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского Сибирского отделения РАН, Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – № 2010137712 ; заявл. 09.09.2010 ; опубл. 27.09.2012 ; Бюл. № 27. – 8 с.

40. Наночастицы меди – модуляторы апоптоза и структурных изменений в некоторых органах / Е. А. Сизова [и др.] // Морфология. – 2013. – Т. 144, № 4. – С. 47–52.

41. Наночастицы металлов, подходы и методы оценки их токсичности / И. М. Трахтенберг [и др.] // 4-й съезд токсикологов России (6–8 нояб. 2013, Москва). – М., 2013. – С. 479–482

42. О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы : Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации ; утв. 23.07.2007. – М., 2007.

43. Оксегендлер, Г. И. Яды и противоядия / Г. И. Оксегендлер. – Л. : Наука, 1982. – 192 с.

44. Онищенко, Г. Г. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в условиях расширенного использования наноматериалов и нанотехнологий / Г. Г. Онищенко // Международный форум по нанотехнологиям : Сб. тез. докл. научно-технологических секций. – М., 2010. – Т. 2. – С. 254–256.

45. Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах : метод. рекомендации. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 103 с.

46. Оценка безопасности контактирующих с пищевыми продуктами упаковочных материалов, полученных с использованием нанотехнологий : метод. указания. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 38 с.

47. Оценка безопасности наноматериалов : метод. рекомендации ; утв. 12.10.2007. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007.

48. Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo* : метод. рекомендации. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 69 с.

49. Оценка воздействия наноматериалов на функцию иммунитета : метод. рекомендации. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 42 с.

50. Поздняков, А. С. Полифункциональные (со)полимеры 1-винил-1,2,4-триазола и нанокомпозиты на их основе : автореф. дис. … канд. хим. наук : 02.00.06 / Поздняков Александр Сергеевич. – Иркутск, 2011. – 22 с.

51. Порядок и методы определения органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных : метод. рекомендации. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 33 с.

52. Порядок медико-биологической оценки действия наноматериалов на лабораторных животных по морфологическим признакам и метаболическим параметрам : метод. указания. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 42 с.

53. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 79 ; утв. 31.10.2007 [Электронный ресурс]. – М., 2007. – Режим доступа : http://www.rg.ru/2007/12/01/koncepciya-doc.html.

54. Преобразование наночастиц серебра и золота в полимерных композитах под действием лазерного излучения / А. С. Поздняков [и др.] // Известия высших учебных заведений. – 2011. – № 2 (2). – С. 247–250.

55. Программа развития наноиндустрии в Российской Федерации до 2015 года ; утв. 17.01.2008. – М., 2008. – 38 с.

56. Проданчук, Н. Г. Нанотоксикология: состояние и перспективы исследований / Н. Г. Проданчук, Г. М. Балан // Современные проблемы токсикологии. – 2009. – № 3-4. – С. 4–20.

57. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : Медиа Сфера, 2002. – 312 с.

58. Руководство по гистологии / Под ред. Р. К. Данилова, В. Л. Быкова. – СПб. : СпецЛит, 2001. – 495 с.

59. Рыжов, С. В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов / С. В. Рыжов, В. В. Новиков // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – № 3, Т. 1. – С. 27–33.

60. Синтез и свойства нанокомпозитов серебра и золота на матрице поли-1-винил-1,2,4-триазола / Г. Ф. Прозорова [и др.] // Журнал структурной химии. – 2010. – Т. 51. – С. 109–112.

61. Скальный, А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека / А. В. Скальный. – М. : Издательский дом «ОНИКС 21 век», 2004. – 216 с.

62. Способ получения арабиногалактана : Пат. 2256668 Рос. Федерация, МПК C08B 37/00 / Бабкин В. А., Колзунова Л. Г., Медведева Е. Н., Малков Ю. А., Остроухова Л. А. ; заявитель и патентообладатель Иркутский институт химии имени А. Е. Фаворского СО РАН. – № 2003122811/04 ; заявл. 20.02.2005 ; опубл. 20.07.2005 ; Бюл. № 20. – 6 с.

63. Сравнительная оценка методов определения апоптотической активности клеток костного мозга у больных хроническим миелолейкозом (флуоресцентная микроскопия и проточная цитометрия) / С. С. Бессмельцев [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 10. – С. 33–36.

64. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов : метод. указания. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2009. – 43 с.

65. Фатхутдинова, Л. М. Токсичность искусственных наночастиц / Л. М. Фатхутдинова, Т. О. Халиуллин, Р. Р. Залялов // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90, № 4. – С. 578–584.

66. Хотимченко, С. А. Оценка риска наноматериалов для здоровья населения / С. А. Хотимченко, И. В. Гмошинский, Н. В. Зайцева // 4-й съезд токсикологов России (6–8 нояб. 2003, Москва). – М., 2013. – С. 530–533.

67. Хотимченко, С. А. Проблема обеспечения безопасности наноразмерных объектов для здоровья человека / С. А. Хотимченко, И. В. Гмошинский, А. В. Тутельян // Гигиена и санитария. – 2009. – № 5. – С. 7–11.

68. Худяков, И. Ф. Металлургия вторичных тяжелых цветных металлов / И. Ф. Худяков, А. П. Дорошкевич, С. В. Карелов. – М. : Металлургия, 1987. – 528 с.

69. Чурилова, А. В. Изменение экспрессии антиапоптотического белка bcl-2 в неокортексе и гиппокампе у крыс под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии / А. В. Чурилова, Т. С. Глущенко, М. О. Самойлов // Морфология. – 2014. – Т. 146, № 5. – С. 7–13.

70. Эмсли, Д. Элементы ; пер. с англ. / Д. Эмсли. – М. : Мир, 1993. – 256 с.

71. A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system / Z. Yang [et al.] // J. R. Soc. Interface. – 2010. – Vol. 7. – P. 411–422.

72. Abdelhalim, M. A. K. Histological alterations in the liver of rats induced by different gold nanoparticle sizes, doses and duration [Электронный ресурс] / M. A. K. Abdelhalim, B. M. Jarrar // J. Nanobiotech. – 2012. – Vol. 10, Iss. 5. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/5.

73. Ablation and optical third-order nonlinearities in Ag nanoparticles / C. Torres-Torres [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2010. – Vol. 5. – P. 925–932.

74. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig / M. Korani [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2011. – Vol. 6. – P. 855–862.

75. Adiseshaiah, P. P. Nanomaterial standards for efficacy and toxicity assessment / P. P. Adiseshaiah, J. B. Hall, S. E. McNeil // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2009. – Vol. 2. – P. 99–112.

76. Alkilany, A. M. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? / A. M. Alkilany, C. J. Murphy // J. Nanopart. Res. – 2010. – Vol. 12. – P. 2313–2333.

77. An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles / P. Maneewattanapinyo [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 2011. – Vol. 73, Iss. 11. – P. 1417–1423.

78. Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and bacillus Calmette – Guérin [Электронный ресурс] / Y. Zhou [et al.] // J. Nanobiotech. – 2012. – Vol. 10, Iss. 19. – Режим доступа : http://www.biomedcentral.com/ 10/1/19.

79. Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane / L. Hung-Li, S. A. Dai, K.-Y. Fu, S. Hsu // Int. J. Nanomed. – 2010. – Vol. 5. – P. 1017–1028.

80. Antimicrobial activity of spherical silver nanoparticles prepared using a biocompatible macromolecular capping agent: evidence for induction of a greatly prolonged bacterial lag phase [Электронный ресурс] / P. Irwin [et al.] // J. Nanobiotech. – 2010. – Vol. 8, Iss. 34. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/34.

81. Antioxidant activity of Siberian larch arabinogalactan intoxication phenylhydrazine and ethylene / S. A. Medvedev [et al.] // Advances in Chemistry and Chemical Engineering Plant Materials. – 2007. – P. 328–331.

82. Antioxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice [Электронный ресурс] / S. BarathManiKanth [et al.] // J. Nanobiotech. – 2010. – Vol. 8, Iss. 16. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/16.

83. Apoptosis leads to a degradation of vital components of active nuclear transport and a dissociation of the nuclear lamina / A. Kramer [et al.] // PNAS . – 2008. – Vol. 105, Iss. 32. – P. 11236–11241.

84. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with juvenile idiopathic arthritis / E. Smolewska [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2003. – N 62. – P. 761–763.

85. Apoptosis – the p53 network / S. Haupt [et al.] // J. Cell Sci. – 2003. – N 116. – P. 4077–4085.

86. Asgharil, S. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna* [Электронный ресурс] / S. Asgharil, S. A. Johari, J. H. Lee // J. Nanobiotech. – 2012. – Vol. 10, Iss. 14. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/14.

87. AshaRani, P. V. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles [Электронный ресурс] / P. V. AshaRani, M. Prakash Hande, S. Valiyaveettil // BMC Cell Biol. – 2009. – Vol. 10, Iss. 65. – Режим доступа : http://www.biomedcentral.com /1471-2121/10/65

88. Assessment of the toxicity of silver nanoparticles *in vitro*: A mitochondrial perspective / J. S. Teodoro [et al.] // Toxicol. in Vitro. – 2011. – Vol. 25. – P. 664–670.

89. Bactericidal action of Ag(0)-antithrombotic sulfated arabinogalactan nanocomposite: coevolution of initial nanocomposite and living microbial cell to a novel nonliving nanocomposite / I. A. Shurygina [et al.] // Nanomed. Nanotech. Biol. Med. – 2011. – Vol. 7. – P. 827–833.

90. Belharouak, I. Silver particles in glasses of the B_2O_3 – ZnO – P_2O_5 / I. Belharouak, F. Well, C. Parent // J. Non-Crystall. Solids. – 2001. – № 293–295. – P. 649–656.

91. Berube, D. M. The public acceptance of nanomedicine: a personal perspective / D. M. Berube // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2009. – Vol. 1. – P. 2–5.

92. Biological barriers. A need for novel tools in nanotoxicology and nanomedicine / C.-M. Lehr [et al.] // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2011. – Vol. 77, Iss. 3. – P. 337.

93. Browning, L. M. Random walk of single gold nanoparticles in zebrafish embryos leading to stochastic toxic effects on embryonic developments / L. M. Browning // Nanoscale. – 2009. – N 1 (1). – P. 138–152.

94. Cash, K. J. Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes / K. J. Cash, H. A. Clark // Trends Mol. Med. – 2010. – Vol. 16, Iss. 12. – P. 584–593.

95. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms / K. Unfried [et al.] // Nanotoxicol. – 2007. – Vol. 1, Iss. 1. – P. 52–71.

96. Central role of mitochondria and p53 in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts / K. Itoh [et al.] // Rheumatology. – 2004. – N 43. – P. 277–285.

97. Characterization of silver nanoparticles synthesized by using marine isolate streptomyces albidoflavus / P. R. Shetty [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 22, Iss. 5. – P. 614–621.

98. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies / K. W. Powers [et al.] // Nanotoxicol. – 2007. – Vol. 1, Iss. 1. – P. 42–51.

99. Chen, H. H. Imaging of apoptosis in the heart with nanoparticle technology / H. H. Chen, L. Josephson, D. E. Sosnovik // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2011. – Vol. 3. – P. 86 99.

100. Cho, E. C. Inorganic nanoparticle-based contrast agents for molecular imaging / E. C. Cho // Trends Mol. Med. – 2010. – Vol. 16, Iss. 12. – P. 561–573.

101. Choi, H. S. Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation / H. S. Choi, J. V. Frangioni // Mol. Imaging. – 2010. – Vol. 9, Iss. 6. – P. 291–310.

102. Chrastina, A. Iodine-125 radiolabeling of silver nanoparticles for *in vivo* SPECT imaging / A. Chrastina, J. E. Schnitzer // Int. J. Nanomed. – 2010. – Vol. 5. – P. 653–659.

103. Chrastina, A. Overcoming *in vivo* barriers to targeted nanodelivery / A. Chrastina, K. A. Massey, J. E. Schnitzer // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2011. – Vol. 3. – P. 421–437.

104. Clark, K. A. Predictive models for nanotoxicology: Current challenges and future opportunities / K. A. Clark, R. H. White, E. K. Silbergeld // Regul. Toxicol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 59. – P. 361–363.

105. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles / R. J. Griffitt [et al.] // Toxicol. Sci. – 2009. – Vol. 107, Iss. 2. – P. 404–415.

106. Cromer Berman, S. M. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles / S. M. Cromer Berman, P. Walczak, J. W. M. Bulte // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2011. – Vol. 3. – P. 343–355.

107. Current Intelligence Bulletin 63. Occupational exposure to titanium dioxide. – Washington : Departament of Health and Human Services ; Centers for Disease Control and Prevention ; National Institute for Occupational Safety and Health, 2011.

108. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells [Электронный ресурс] / I. Pujalté [et al.] // Particle and Fibre Toxicol. – 2011. – Vol. 8, Iss. 10. – Режим доступа : http://www.particleandfibretoxicology.com/content/8/1/10.

109. Development of molecular imaging and nanomedicine in China / B. Shen [et al.] // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2011. – Vol. 3. – P. 533–544.

110. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate [Электронный ресурс] / K. Loeschner [et al.] // Particle and Fibre Toxicol. – 2011. – Vol. 8, Iss. 18. – Режим доступа : http://www.particleandfibretoxicology.com/content/8/1/18.

111. Divergent effects of tumor necrosis factor- on apoptosis of human neutrophils / J. M. van den Berg [et al.] // J. Leukocyte Biol. – 2001. – N 69. – P. 467–473.

112. DNA-nanoparticle assemblies go organic: Macroscopic polymeric materials with nanosized features [Электронный ресурс] / E. D. Mentovich [et al.] // J. Nanobiotech. – 2012. – Vol. 10, Iss. 21. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/21.

113. Dobrovolskaia, M. A. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution / M. A. Dobrovolskaia // Mol. Pharm. – 2008. – Vol. 5, Iss. 4. – P. 487–495.

114. Dykman, L. A. Gold nanoparticles in biology and medicine: Recent advances and prospects / L. A. Dykman, N. G. Khlebtsov // Acta Naturae. – 2011. – Vol. 3, Iss. 2. – P. 34–55.

115. Effect of poly-α, γ, L-glutamic acid as a capping agent on morphology and oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles / M. Stevanović [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2011. – Vol. 6. – P. 2837–2847.

116. Effects of aggregation and the surface properties of gold nanoparticles on cytotoxicity and cell growth / W. Cui [et al.] // Nanomed. Nanotech. Biol. Med. – 2012. – Vol. 8. – P. 46–53.

117. Egg white-mediated green synthesis of silver nanoparticles with excellent biocompatibility and enhanced radiation effects on cancer cells / R. Lu [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2012. – Vol. 7. – P. 2101–2107.

118. Elavazhagan, T. Memecylon edule leaf extract mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles / T. Elavazhagan, K. D. Arunachalam // Int. J. Nanomed. – 2011. – Vol. 6. – P. 1265–1278.

119. Elsaesser, A. Toxicology of nanoparticles / A. Elsaesser, C. V. Howard // Adv. Drug Delivery Rev. – 2012. – Vol. 64, Iss. 2. – P. 129–137.

120. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles / B. Kong [et al.] // Nanomed. (Lond.). – 2011. – Vol. 6, Iss. 5. – P. 929–941.

121. Exposure in developing zebrafish produces persistent synaptic and behavioral changes / C. M. Powers [et al.] // Neurotoxicol. Teratol. – 2011. – Vol. 33 (2). – P. 329–332.

122. Fabrication of silver nanoparticles doped in the zeolite framework and antibacterial activity / K. Shameli [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2011a. – Vol. 6. – P. 331–341.

123. Fakruddin, M. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective [Электронный ресурс] / M. Fakruddin, Z. Hossain, H. Afroz // J. Nanobiotech. – 2012. – Vol. 10, Iss. 31. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology. com/content/10/1/31.

124. Geiser, M. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles [Электронный ресурс] / M. Geiser, W. G. Kreyling // Particle and Fibre Toxicol. – 2010. – Vol. 7, Iss. 2. – Режим доступа : http://www.particleandfibretoxicology. com/content/7/1/2.

125. Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice *in vivo* / C. G. Ordzhonikidze [et al.] // Acta Naturae. – 2009. – № 3. – P. 99–101.

126. Gorth, D. J. Silver nanoparticle toxicity in *Drosophila*: size does matter / D. J. Gorth, D. M. Rand, T. J. Webster // Int. J. Nanomed. – 2011. – Vol. 6. – P. 343–350.

127. Guzman, M. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria / M. Guzman, J. Dille, S. Godet // Nanomed. Nanotech. Biol. Med. – 2012. – Vol. 8. – P. 37–45.

128. Gwinn, M. R. Risk management of nanomaterials / M. R. Gwinn, L. Tran // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2010. – Vol. 2. – P. 130–137.

129. Haase, A. Application of laser postionization secondary neutral mass spectrometry/time-of-flight secondary ion mass spectrometry in nanotoxicology: visualization of nanosilver in human macrophages and cellular responses / A. Haase // ASC Nano. – 2011. – Vol. 5, Iss. 4. – P. 3059–3068.

130. Health and safety implications of occupational exposure to engineered nanomaterials / L. V. Stebounova [et al.] // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2012. – Vol. 4. – P. 310–321.

131. Hoet P. H. M. Nanoparticles – known and unknown health risks [Электронный ресурс] / P. H. M. Hoet, I. Brüske-Hohlfeld, O. V. Salata // J. Nanobiotech. – 2004. – Vol. 2, Iss. 12. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology. com/content/2/1/12.

132. Hussain, S. M. Safety evaluation of silver nanoparticles: inhalation model for chronic exposure / S. M. Hussain, J. J. Schlager // Toxicol. Sci. – 2009. – Vol. 108, Iss. 2. – P. 223–224.

133. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells / L. Braydich-Stolle [et al.] // Toxicol. Sci. – 2005. – Vol. 88, Iss. 2. – P. 412–419.

134. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos / K. J. Lee [et al.] // ACS Nano. – 2007. – Vol. 1 (2). – P. 133–143.

135. Informatics and standards for nanomedicine technology / D. G. Thomas [et al.] // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2011. – Vol. 3. – P. 511–532.

136. Inhalation studies for the safety assessment of nanomaterials: status quo and the way forward / R. Landsiedel [et al.] // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2012. – Vol. 4. – P. 399–413.

137. Jia, G. Cytotoxicity of carbon nanomaterialls: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene / G. Jia, H. Wang, L. Tan // Environ. Sci. Technol. – 2005. – Vol. 39, Iss. 5. – P. 1378–1383.

138. Jones, C. In vitro assessments of nanomaterial toxicity / C. Jones, D. W. Grainger // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2009. – Vol. 61, Iss. 6. – P. 438–456.

139. Kartini, E. Neutron scattering and thermal measurements on the superionic – conducting Ag_2S – $AgPO_3$ glass system / E. Kartini, M. F. Collins, C. C. Lovekin // J. Non-Crystal. Solids. – 2001. – N 312 (3145). – P. 633–636.

140. Kartini, E. Structural, thermal and electrical properties of AgI – Ag_2S – $AgPO_3$ superionic glasses / E. Kartini, S. J. Kenedy, T. Sakuma // J. Non-Crystal. Solids. – 2002. – N 312 (314). – P. 628–632.

141. Kim, S. Phagocytosis and endocytosis of silver nanoparticles induce interleukin-8 production in human macrophages / S. Kim, I.-H. Choi // Yonsei Med. J. – 2012. – Vol. 53, Iss. 3. – P. 654–657.

142. Kolzunova, L. G. Investigation of antioxidant activity of arabinogalactan electrochemical methods / L. G. Kolzunova, R. N. Goldsmith, E. S. Shaydurova // Analytics of Siberia and the Far East. – Tomsk : TPU, 2008. – P. 132.

143. Kuiken, T. Nanomedicine and ethics: is there anything new or unique? / T. Kuiken // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2011. – Vol. 3. – P. 111–118.

144. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism [Электронный ресурс] / E. Sadauskas [et al.] // Particle and Fibre Toxicol. – 2007. – Vol. 4, Iss. 10. – Режим доступа : http://www.particleandfibretoxicology.com /content/4/1/10.

145. Lansdown, A. B. G. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices [Электронный ресурс] / A. B. G. Lansdown // Adv. Pharmacol. Sci. – 2010. – Vol. 2010. – Режим доступа : http://www.hindawi.com/journals/aps/2010/910686.

146. Larch arabinogalactan promising polymer matrix for biogenic metals / S. A. Medvedev [et al.] // Butlerov Commun. – 2002. – Vol. 7. – P. 45–49.

147. Laser-fabricated castor oil-capped silver nanoparticles / R. Zamiri [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2011. – Vol. 6. – P. 565–568.

148. Lee, S. B. Nanotoxicology: toxicity and biological effects of nanoparticles for new evaluation standards / S. B. Lee // Nanomedicine. – 2011. – Vol. 6, Iss. 5. – P. 759–761.

149. McNeil, S. E. Nanoparticle therapeutics: a personal perspective / S. E. McNeil // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2009. – Vol. 1. – P. 264–271.

150. McNerny, D. Q. Understanding specific and nonspecific toxicities: a requirement for the development of dendrimer-based pharmaceuticals / D. Q. McNerny, P. R. Leroueil, J. R. Baker // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2010. – Vol. 2. – P. 249–259.

151. Metallic nickel nano- and fine particles induce JB6 cell apoptosis through a caspase-8/AIF mediated cytochrome c-independent pathway [Электронный ресурс] / J. Zhao [et al.] // J. Nanobiotech. – 2009. – Vol. 7, Iss. 2. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology.com/content/7/1/2.

152. Micro-PIXE study of Ag in digestive glands of a nano-Ag fed arthropod (Porcellio scaber, Isopoda, Crustacea) / Z. P. Tkalec [et al.] // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. – 2011. – Vol. 269. – P. 2286–2291.

153. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery / M. Liong [et al.] // ACS Nano. – 2008. – Vol. 2, Iss. 5. – P. 889–896.

154. Nallathamby, P. D. Study of cytotoxic and therapeutic effects of stable and purified silver nanoparticles on tumor cells / P. D. Nallathamby, X.-H. N. Xu // Nanoscale. – 2010. – Vol. 9, Iss. 2 (6). – P. 942–952.

155. Nanomaterials and REACH. Background paper on the position of German competent authorities [Электронный ресурс]. – 2012. – 52 с. – Режим доступа : http://www.reach-clp-biozid-helpdesk.de/de/Downloads/Hintergrundpapier%20Nano%20und%20REACH%20engl.%20Version.pdf?__blob=publicationFile.

156. Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications / R. Ranganathan [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2012. – Vol. 7. – P. 1043–1060.

157. Nanoparticles and the immune system / B. S. Zolnik [et al.] // Endocrinol. – 2010. – Vol. 151, Iss. 2. – P. 458–465.

158. Nanoparticles for applications in cellular imaging / K. T. Thurn [et al.] // Nanoscale Res. Lett. – 2007. – Vol. 2. – P. 430–441.

159. Nanoparticles, human health hazard and regulation / A. Seaton [et al.] // J. R. Soc. Interface. – 2010. – Vol. 7. – P. 119–129.

160. Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model [Электронный ресурс] / L. V. Stebounova [et al.] // Particle and Fibre Toxicol. – 2011. – Vol. 8, Iss. 5. – Режим доступа : http://www.particleandfibretoxicology.com/content/8/1/5.

161. Nanotechnology and the treatment of HIV infection / R. Parboosing [et al.] // Viruses. – 2012. – Vol. 4. – P. 488–520.

162. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications / J. Shi [et al.] // Nano Lett. – 2010. – Vol. 10, Iss. 9. – P. 3223–3230.

163. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience / W. H. Suh [et al.] // Prog. Neurobiol. – 2009. – Vol. 87, Iss. 3. – P. 133–170.

164. Nanotoxicology / K. Donaldson [et al.] // Occup. Envir. Med. – 2004. – Vol. 61. – P. 727–728.

165. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs / J. Ai [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2011. – Vol. 6. – P. 1117–1127.

166. Nanotoxicology: characterizing the scientific literature, 2000–2007 / A. D. Ostrowski [et al.] // J. Nanopart Res. – 2009. – Vol. 11. – P. 251–257.

167. Novel approaches for drug delivery systems in nanomedicine: effects of particle design and shape / N. Daum [et al.] // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2012. – Vol. 4. – P. 52–65.

168. Novel microfilaricidal activity of nanosilver / S. K. Singh [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2012. – Vol. 7. – P. 1023–1030.

169. Oberdörster, G. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective / G. Oberdörster, V. Stone, K. Donaldson // Nanotoxicology. – 2007. – Vol. 1, Iss. 1. – P. 2–25.

170. PD 6699-2:2007. Nanotechnologies. Part 2: Guide to safe handling and disposal of manufactured nanomaterials [Электронный ресурс] / British Standards Institution. – 2007. – Режим доступа : http://shop.bsigroup.com/forms/Nano/PD-6699-2.

171. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy [Электронный ресурс] / G. Oberdörster [et al.] // Particle and Fiber Toxicol. – 2005. – Vol. 2, Iss. 8. – Режим доступа : http://www.nanowerk.com/nanotechnology/reports/reportpdf/report34.pdf.

172. Prow, T. W. Toxicity of nanomaterials to the eye / T. W. Prow // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2010. – Vol. 2. – P. 317–333.

173. Ray, P. C. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: Challenges and future needs / P. C. Ray, H. Yu, P. P. Fu // Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. – 2009. – Vol. 27, Iss. 1. – P. 1–35.

174. Regenerative nanomedicine and the treatment of degenerative retinal diseases / M. A. Zarbin [et al.] // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2012. – Vol. 4. – P. 113–137.

175. Salata, O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine [Электронный ресурс] / O. V. Salata // J. Nanobiotech. – 2004. – Vol. 2, Iss. 3. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3.

176. Samberg, M. E. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin *in vivo* and keratinocytes *in vitro* / M. E. Samberg, S. J. Oldenburg, N. A. Monteiro-Riviere // Environ. Health Perspect. – 2010. – Vol. 118, Iss. 3. – P. 407–413.

177. Sayes, C. M. Characterization of nanomaterials for toxicity assessment / C. M. Sayes, D. B. Warheit // WIREs Nanomed. Nanobiotech. – 2009. – Vol. 1. – P. 660–670.

178. Scown, T. M. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout / T. M. Scown, E. M. Santos, B. D. Johnston // Toxicol. Sci. – 2010. – Vol. 115 (2). – P. 521–534.

179. Silver impairs neurodevelopment: Studies in PC12 cells / C. M. Powers [et al.] // Envir. Health Perspect. – 2010. – Vol. 118. – P. 73–79.

180. Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells / W. J. Trickler [et al.] // Toxicol. Sci. – 2010. – Vol. 118 (1). – P. 160–170.

181. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds [Электронный ресурс] / H. H. Lara [et al.] // J. Nanobiotech. – 2011. – Vol. 9, Iss. 30. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology.com/content/9/1/30.

182. Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: Critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition / C. M. Powers [et al.] // Envir. Health Perspect. – 2011b. – Vol. 119, Iss. 1. – P. 37–44.

183. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells / L. K. Braydich-Stolle [et al.] // Toxicol. Sci. – 2010. – Vol. 116, Iss. 2. – P. 577–589.

184. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in Drosophila melanogaster / M. Ahamed [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2010. – Vol. 242. – P. 263–269.

185. Simkó, M. Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: A critical review [Электронный ресурс] / M. Simkó, M. Mattsson // Particle and Fibre Toxicol. – 2010. – Vol. 7, Iss. 42. - Режим доступа : http://www.particleandfibretoxicology.com/content/7/1/42.

186. SiO_2 nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells [Электронный ресурс] / X. Yang [et al.] // Particle and Fibre Toxicol. – 2010. – Vol. 7, Iss. 1. - Режим доступа : http://www.particleandfibretoxicology.com/content/7/1/1.

187. Smith, M. D. Apoptosis a relevant therapeutic target in rheumatoid arthritis? / M. D. Smith, J. G. Walker // Rheumatol. – 2004. – N 43. – P. 405–407.

188. Soloviev, M. Nanobiotechnology today: focus on nanoparticles [Электронный ресурс] / M. Soloviev // J. Nanobiotech. – 2007. – Vol. 5, Iss. 11. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology.com/content/5/1/11.

189. Structural and thermal studies of silver nanoparticles and electrical transport study of their thin films [Электронный ресурс] / M. A. Majeed Khan [et al.] // Nanoscale Res. Lett. – 2011. – Vol. 6, Iss. 434. – Режим доступа : http://www.nanoscalereslett.com/content/6/1/434.

190. Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles [Электронный ресурс] / J. H. Sung [et al.] // Particle and Fibre Toxicol. – 2011. – Vol. 8, Iss. 16. – Режим доступа : http://www.particleandfibretoxicology.com/content/8/1/16.

191. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles [Электронный ресурс] / Y. S. Kim [et al.] // Particle and Fibre Toxicol. – 2010. – Vol. 7, Iss. 20. – Режим доступа : http://www.particleandfibretoxicology.com/content/7/1/20.

192. Suna, C. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery / C. Suna, J. S. H. Leeb, M. Zhanga // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2008. – Vol. 60, Iss. 11. – P. 1252–1265.

193. Sung, J. H. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles / J. H. Sung, J. H. Ji, J. D. Park // Toxicol. Sci. – 2009. – Vol. 108 (2). – P. 452–461.

194. Synthesis and characterization of silver(montmorillonite) chitosan bionanocomposites by chemical reduction method and their antibacterial activity / K. Shameli [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2011b. – Vol. 6. – P. 271–284.

195. Technical Report ISO/TR 27628. Workplace atmospheres – ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosols. Inhalation exposure characterization and

assessment [Электронный ресурс]. – Режим доступа : http://www.iso.org/iso /iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=44243%20%20.

196. Tegeder, I. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors / I. Tegeder, J. Pfeilschifter, G. Geisslinger // FASEB J. – 2001. – N 15. – P. 2057–2072.

197. Time-dependent effect in green synthesis of silver nanoparticles / M. Darroudi [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2011. – Vol. 6. – P. 677–681.

198. Towards nanotechnology regulation – publish the unpublishable / S. Hankina [et al.] // Nano Today. – 2011. – Vol. 6. – P. 228–231.

199. Toxicity and antibacterial assessment of chitosancoated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells / P. Jena [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2012. – Vol. 7. – P. 1805–1818.

200. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna* [Электронный ресурс] / S. Asghari [et al.] // J. Nanobiotech. – 2012. – Vol. 10, Iss. 14. – Режим доступа : http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/14.

201. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging / C. Stensberg [et al.] // Nanomed. (Lond.). – 2011. – Vol. 6 (5). – P. 879–898.

202. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi / A. Chwalibog [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2010. – Vol. 5. – P. 1085–1094.

203. Walker, N. J. A 21st century paradigm for evaluating the health hazards of nanoscale materials / N. J. Walker, J. R. Bucher // Toxicol. Sci. – 2009. – Vol. 110, Iss. 2. – P. 251–254.

204. Weiss, C. A special issue on nanotoxicology / C. Weiss, S. Diabate // Arch. Toxicol. – 2011. – Vol. 85. – P. 705–706.

205. Win-Shwe, T. Nanoparticles and neurotoxicity / T. Win-Shwe, H. Fujimaki // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – Vol. 12. – P. 6267–6280.

206. Yokel, R. A. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention [Электронный ресурс] / R. A. Yokel, R. C. MacPhail // J. Occup. Med.

Toxicol. – 2011. – Vol. 6, Iss. 7. – Режим доступа : http://www.occup-med.com /content/6/1/7.

207. Zhao, C. M. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna* / C. M. Zhao, W. X. Wang // Environ. Toxicol. Chem. – 2011. – Vol. 30 (4). – P. 885–892.