

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРА АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ

В работе представлены результаты исследований влияния наночастиц меди на показатель готовности клеток к апоптозу и структурные изменения тканей печени при различных способах введения в организм. Полученные данные позволяют предложить в качестве критерия для оценки безопасности введения наночастиц меди в организм – показатель готовности клеток к апоптозу, определенный по экспрессии антигена каспазы-3.

Ключевые слова: апоптоз, наночастицы меди, печень.

Введение

В настоящее время перспективным является использование достижений современных нанотехнологий, что позволит решить многие задачи в области медицины и ветеринарии. Это создание новых материалов для хирургии, разработка эффективных систем доставки лекарств в организм, диагностика и контроль за ходом лечения больных, использование наноматериалов для новых лекарственных препаратов и биопрепаратов. Наряду с традиционными лекарственными средствами, содержащими металл, появляются новые лекарственные средства на основе наночастиц. Так, созданы повязки с кристаллическим серебром для лечения ран, ожогов, трофических язв [9]. Действительно, свойства нанометаллов отличаются как от свойств массивных образцов, так и от свойств отдельных атомов, их токсичность в 7-50 раз меньше по сравнению с солями, они обладают полифункциональным и пролонгированным действием, легко проникают во все органы и ткани, в биотических дозах стимулируют обменные процессы и т.д. [3, 7]. В тоже время перечисленные особенности наночастиц могут оказывать на живые системы такое действие, которое будет способствовать развитию различных патологических состояний и даже приводить к гибели. Поэтому исследованиям ответной реакции живых систем на наноматериалы посвящено ряд работ. Изучают степень повреждения ДНК и цитотоксичность наночастиц оксидов различных металлов [11]. Продолжаются сравнительные исследования токсичности наночастиц, например, меди по сравнению с микрочастицами и ионами металлов [10].

В тоже время отсутствуют данные по изменению структурно-функционального состояния тканей животных при увеличении нагрузки металлов в виде наночастиц на организм, отсутствуют критерии, по которым можно решить вопрос о безопасности введения данного наноматериала. В связи с этим, в настоящей работе представлены

результаты исследований изменения показателя апоптоза – маркера запрограммированной гибели клеток и структуры тканей при увеличении нагрузки наночастиц меди на организм.

Материалы и методы

Исследования проводили на белых крысах-самцах линии Vistar массой 150-180 г, которым внутримышечно вводили водную суспензию наночастиц меди с периодичностью 1 раз в неделю в дозе 2,0 мг/кг массы животного. Другой группе животных на протяжении 3 суток выпаивали суспензию наночастиц меди в дозе 2,0 мг/кг массы животного. Наночастицы меди получали методом высокотемпературной конденсации на установке Миген-3 с их последующей модификацией кислородом [2, 4], сферической формы, размером $103,0 \pm 2,0$ нм; с содержанием кристаллической меди в ядре $96,0 \pm 4,5$ %, меди оксида – $4,0 \pm 0,4$ %; и толщиной оксидной пленки на поверхности – 6 нм. Отбор проб проводили через 3 час., 1 сут., 3 сут., 7 сут. после каждой инъекции и через 1 час., 2 часа после энтерального введения животным водной суспензии наночастиц. Контрольной группе внутримышечно и энтерально вводили дистиллированную воду в том же объеме.

Для оценки пролиферативной активности клеток использовали показатель экспрессии маркера Ki-67. Для выявления готовности клеток к апоптозу оценивали экспрессию антигена каспазы-3. Иммуногистохимические исследования [8] проводили на парафиновых срезах с использованием моноклональных антител и системы визуализации фирмы Bio Genex Super Sensytive Detection System (США). Проводили подсчет иммунопозитивных клеток среди 1000 и выражали в %.

Результаты исследований

На фоне структурной реорганизации тканей при действии наночастиц меди происходят изменения показателя готовности клеток к апоптозу –

запрограммированной гибели клеток. Известно, что апоптоз – форма гибели клеток, при которой происходит их самоуничтожение, наступающее вследствие повреждения ДНК в ядре клетки и которое не может быть исправлено системой репарации. За данным процессом следит белок, кодируемый геном p53. При невозможности устранения дефекта ДНК под действием p53-протеина активируется программа апоптоза [1]. Известно, что микроэлементы играют существенную роль в регуляции апоптоза, которые могут усиливать эффект как при дефиците, так и при избытке элементов или в результате дисбаланса ряда жизненно важных микроэлементов. Так, цинк является селективным ингибитором апоптоза, марганец, кадмий, свинец, галлий и др. способны модулировать апоптоз, т.е. по-разному влиять в зависимости от дозы [6]. Элементы селен, цинк, железо, медь препятствуют реализации геноповреждающего действия [5]. Учитывая эти данные, нами проведено изучение готовности клеток различных тканей к апоптозу, оцененному по экспрессии антигена каспазы-3, при увеличении нагрузки наночастиц меди на организм.

В печени контрольных животных экспрессия каспазы-3 обнаружена только среди центрoлобулярных гепатоцитов и составляет $0,7 \pm 0,03\%$. Апоптоз – положительные клетки также выявляются среди центрoлобулярных гепатоцитов и составляют $0,5 \pm 0,02\%$. После повторного внутримышечного введения наночастиц меди клетки, экспрессирующие антиген каспазы-3, а также дающие положительную реакцию на фрагментированную ДНК обнаруживаются и среди припортальных гепатоцитов. Различия показателей экспрес-

сии маркеров – готовности клеток к апоптозу достоверны по сравнению с контролем в печени животных через 3 и 7 суток после трехкратного внутримышечного введения наночастиц. Показатели экспрессии увеличиваются в 2 раза ($p \leq 0,05$) через 7 суток после трехкратного внутримышечного введения (таблица 1).

При энтеральном введении наночастиц меди в дозе 2 мг/кг массы животных готовность клеток к апоптозу клеток печени после трехкратного энтерального введения (суммарная доза – 6 мг/кг массы животного) недостоверно отличается от показателей экспрессии маркеров апоптоза в печени животных контрольной группы (таблица 2). В тоже время после трехкратного энтерального введения наночастиц меди (суммарная доза – 6 мг/кг массы животного) показатель экспрессии каспазы-3 в проксимальных канальцах почек увеличивается в 1,6 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

Следовательно, при увеличении нагрузки наночастиц меди на организм помимо структурной реорганизации тканей, происходит достоверное усиление экспрессии антигена каспазы-3 в клетках печени через 3, 7 суток после 3-кратного внутримышечного введения наночастиц меди (суммарная доза – 6 мг/кг массы животного).

Полученные данные свидетельствуют о высокой биологической активности наночастиц меди при введении в организм. Гепатотоксичность наночастиц меди проявляется в дозе 6 мг/кг. Причем, готовность к апоптозу наблюдается в припортальных гепатоцитах после 3 сут.

Установленное нами свойство наночастиц меди в нетоксичных дозах (2 мг/кг – 6 мг/кг) по-

Таблица 1. Показатели экспрессии антигена каспазы-3 при внутримышечном введении наночастиц меди в дозе 2 мг/кг массы животного, ‰

Группы	Частота введения наночастиц меди											
	Первое введение				Второе введение				Третье введение			
	Время после введения											
	3 час.	1 сут.	3 сут.	7 сут.	3 час.	1 сут.	3 сут.	7 сут.	3 час.	1 сут.	3 сут.	7 сут.
контроль	$0,7 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,03$	$0,7 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,02$
опыт	$0,7 \pm 0,04$	$0,65 \pm 0,04$	$0,8 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,03$	$0,9 \pm 0,05$	$0,7 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,05$	$0,71 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,04$	$1,0 \pm 0,04$	$1,1 \pm 0,03^{**}$	$1,5 \pm 0,06^{**}$

Таблица 2. Показатели экспрессии антигена каспазы-3 в клетках печени при энтеральном введении наночастиц меди в дозе 2 мг/кг массы животного, ‰

Группы	Частота введения наночастиц меди					
	Первое введение		Второе введение		Третье введение	
	Время после введения					
	1 час.	2 час.	1 час.	2 час.	1 час.	2 час.
контроль	$0,5 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,04$
опыт	$0,6 \pm 0,03$	$0,56 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,05$	$0,58 \pm 0,07$	$0,69 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,05$

вышать готовность клеток к апоптозу может быть использовано в химиотерапии злокачественных новообразований, в которых происходит торможение апоптоза клеток, содержащих мутации. Кроме того, на основании проведенных исследований становится очевидно, что показатель готовности клеток к апоптозу отражает начавшиеся необратимые структурные изменения независимо от специфики ткани в ответ на введение наночастиц

меди. Это дает нам основание предложить показатель апоптоза в качестве критерия для оценки безопасности введения наночастиц меди в организм живых систем. По этому показателю можно судить о допустимых дозах вводимого металла, об органах-мишенях, установить оптимальные и безопасные способы введения наночастиц в организм для дальнейшего использования их в составе лекарственных средств и биопрепаратов.

16.09.2011

Список литературы:

1. Галицкий В.А. Возникновение эукариотических клеток и происхождение апоптоза // Цитология, 2005, том 47, вып. 2, С. 103.
2. Ген М.Я., Миллер А.В. // Авторское свидетельство СССР № 814432. Бюллетень изобретений.1981. №11. С.25.
3. Глушченко Н.Н., Богословская О.А., Ольховская И.П. // Физико-химические закономерности биологического действия высокодисперсных порошков металлов. Химическая физика. 2002. Т. 21(4) . С. 79.
4. Жигач А.Н., Лейпунский И.О., Кусков М.Л., Стоенко Н.И., Сторожев В.Б. Установка для получения и исследования физико-химических свойств наночастиц металлов.// Приборы и техника эксперимента. 2000. №6. С.122.
5. Калетина Н.И., Калетин Г.И. Микроэлементы-биологические регуляторы.// М.: Наука в России, изд. РАН, 2007, № 1. С.50.
6. Кудрин А.В., Жаворонков А.А. Роль микроэлементов и кальция в регуляции апоптоза.//Успехи современной биологии. 1998. 7 с.
7. Патент на изобретение № 2306141. Препарат, ускоряющий ранозаживление. Байтукалов Т.А., Глушченко Н.Н., Богословская О.А., Ольховская И.П., Лейпунский И.О., Жигач А.Н., Шафрановский Э.А. Заявка № 2005141039. Приоритет изобретения 28 декабря 2005 г. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 20 сентября 2007 г.
8. Пирс Э. Гистохимия. Теоретическая и прикладная. М., 1962. 962 с.
9. Рахметова А.А., Алексеева Т.П., Богословская О.А., Лейпунский И.О., Ольховская И. П., Жигач А.Н., Глушченко Н.Н. Ранозаживляющие свойства наночастиц меди в зависимости от их физико-химических характеристик. // Российские нанотехнологии. 2010. Т.5. № 3-4. С.102.
10. Karlsson H.L., Cronholm P, Gustafsson J, Muller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes.// Chem Res Toxicol. 2008. 21(9). P.1726.
11. Murray A.R., Kisin E, Leonard S.S., Young S.H., Kommineni C, Kagan V.E., Castranova V, Shvedova A.A. //Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. Toxicology. 2009. 257(3). P. 161.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований

№ 11-04-97077 – р_поволжье_а

UDC 577.391

Sizova E. A.¹, Tantsikuzhina A.A.¹, Polyakova V.S.²

¹Orenburg State University; ²Orenburg State Medical Academy of Federal Agency in Public Health and Social Development, e-mail: Sizova.L78@yandex.ru

EXPRESSION OF MARKERS OF APOPTOSIS IN LIVER CELLS AT DIFFERENT WAYS ADMINISTRATION OF COPPER NANOPARTICLES

Results of research on copper nanoparticles influence on index of readiness to apoptosis and structural changes of liver, under copper multiple introductions into organism of animals are presented in the article. Received data enables us to propose using index of cells readiness to apoptosis defined by Caspase-3 expression as a criterion for copper nanoparticles introduction safety assessment.

Key words: apoptosis, copper nanoparticles, liver

Bibliography:

1. Galitsky V.A. The emergence of eukaryotic cells and the origin of apoptosis // Cytology, 2005, volume 47, no. 2, p. 103.
2. Gen M.Ya., Miller A.V. //Author's certificate of the USSR № 814432. Bulletin of discoveries.1981. №11. p.25.
3. Glushchenko N.N., Bogoslovskaya O.A., Olkhovskaya I.P. // Physical and chemical laws of biological effect of superfine metal powders. Chemical physics. 2002. V. 21(4) . p. 79.
4. Zhigach A.N., Leipunsky I.O., Kuskov M.L., Stoenko N.I., Storozhev V.B. Facility for producing and studying physical and chemical properties of metal nanoparticles.//Instruments and experimental techniques. 2000. №6. p.122.
5. Kaletina N.I., Kaletin G.I. Minor constituenes – biological controls.//M.: Science in Russia, ed. Academy of Sciences, 2007, № 1. p.50.
6. Kudrin A.V., Zhavoronkov A.A. The role of minor constituenes and calcium in the regulation of apoptosis.//Successes of modern biology. 1998. 7 p.
7. The patent for the invention № 2306141. The drug which accelerates wound healing. Baytukalov T.A, Glushchenko N.N., Bogoslovskaya O.A., Olkhovskaya I.P., Leipunsky I.O., Zhigach A.N., Shafranovsky E.A. Application number 2005141039. Priority of invention December 28, 2005 Registered in the National Registry of Inventions of the Russian Federation, September 20, 2007
8. Pierce E. Histochemistry. Theoretical and Applied. Moscow, 1962. 962 p.
9. Rakhmetova A.A., Alekseeva T.P., Bogoslovskaya O.A., Leipunsky I.O., Olkhovskaya I.P., Zhigach A.N., Glushchenko N.N. Wound healing properties of copper nanoparticles depending on their physical and chemical characteristics. //Russian nanotechnology. 2010. Vol.5. № 3-4. P.102.
10. Karlsson H.L., Cronholm P, Gustafsson J, Muller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes.// Chem Res Toxicol. 2008. 21(9). P.1726.
11. Murray A.R., Kisin E, Leonard S.S., Young S.H., Kommineni C, Kagan V.E., Castranova V, Shvedova A.A. //Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. Toxicology. 2009. 257(3). P. 161.