

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК КРЫС

А. Я. Почепцов, Ю. И. Великородная, Б. Н. Филатов

Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии России, Волгоград

Изучали репродуктивную токсичность наночастиц золота размером 5 и 20 нм на самцах белых крыс. При аутометаллографическом исследовании наночастицы золота обнаруживали в соединительнотканной оболочке семенников. Иммуногистохимическое изучение экспрессии антигена PCNA показало его снижение в сперматоцитах I и II порядка.

Ключевые слова: наночастицы золота, репродуктивная токсичность, аутометаллография, иммуногистохимия, PCNA.

EFFECTS OF GOLD NANOPARTICLES ON THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF GERM CELLS IN RATS

A. Y. Pocheptsov, Y. I. Velikorodnaya, B. N. Filatov

Autometallographic and immunohistochemical studies to investigate reproductive toxicity of 5 and 20 nm gold nanoparticles in male albino rats were carried out. In the autometallographic study, gold nanoparticles were found only in tunica albuginea of the testis. The immunohistochemical study indicated a significant reduction in the expression of PCNA in I and II spermatocytes.

Key words: golden nanoparticles, reproductive toxicity, autometallography, immunohistochemistry, PCNA.

Развитие нанотехнологий, характеризуясь высоким приростом числа новых нанопродуктов, сопровождается существенным отставанием в разработке регламентов безопасности их производства и применения. Одним из наиболее значимых показателей при гигиеническом нормировании тех или иных продуктов является изучение их влияния на репродуктивную функцию, в том числе изучение сперматогенеза у экспериментальных животных.

Сперматогенез — это сложный биологический процесс, высокочувствительный к неблагоприятным экологическим факторам. Многие химические вещества оказывают как прямое негативное влияние непосредственно на зрелые половые клетки, так и на клетки-предшественники, находящиеся в стадии пролиферации и дифференцировки. Такие показатели, как масса семенников и количество сперматозоидов в семенной жидкости, широко используемые для определения функциональных изменений в семенниках в результате воздействия токсиканта, не дают ответа на вопрос о механизмах репродуктивной токсичности и ее ранних проявлениях. Рутинные гистологические методы также не являются достаточно чувствительными для выявления нарушений сперматогенеза на ранних этапах. Поэтому все чаще в токсикологических исследованиях используют иммуногистохимические методы для выявления изменений в процессах пролиферации и дифференцировки половых клеток при воздействии гонадотоксических веществ с использованием теста на PCNA [9].

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) — ядерный белок с молекулярной массой 36 кДа, известный также как циклин, выступает в качестве вспомогательного белка к ДНК-полимеразе. Экспрессия PCNA начинает выявляться в ядре делящейся клетки в фазе G1, достигает максимума в фазе S и постепенно снижается

к концу фазы G2. Поэтому PCNA считается маркером клеточной пролиферации [7].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение влияния наночастиц золота на репродуктивную функцию крыс-самцов по стандартной методике [2].

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Наночастицы золота. Наночастицы золота (НЧЗ) диаметром 5 и 20 нм были получены методом цитратного восстановления золотохлористоводородной кислоты [1] в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Концентрация 5 нм частиц золота составила 7×10^{13} в 1 мл, 20 нм — 8×10^{11} в 1 мл. Определение размеров наночастиц и их концентрации проводили с помощью анализатора размеров частиц ZetaSizer Nano (Malvern Instruments) и электронного трансмиссионного микроскопа Libra-120 (Carl Zeiss).

Экспериментальные животные. Исследование выполнено на 40 беспородных белых крысах массой тела 200—250 г, 20 из которых служили контролем. Животные находились на стандартном лабораторном рационе, со свободным доступом к воде и пище.

I опытной группе животных ($n = 10$) в течение 8 недель вводили внутривенно НЧЗ диаметром 5 нм в количестве 1 мл на животное, II группе ($n = 10$) — НЧЗ диаметром 20 нм в том же объеме в течение 8 недель. Контрольной группе в аналогичном объеме вводили физиологический раствор в течение 8 недель. Выводили животных из эксперимента декапитацией и производили забор образцов ткани семенников, а также печени и селезенки.

Аутометаллография. Для определения наночастиц золота в семенниках был использован метод ауто-

металлографии (AMG-метод), основанный на принципе увеличения размеров наночастиц с помощью ионов серебра, в результате чего они становятся видимыми в светооптическом микроскопе [4].

В нашей работе был использован AMG-метод в модификации Hacker, так как он характеризуется стабильной воспроизводимостью при больших объемах исследования и не требует соблюдения жестких условий проведения реакции в темноте [5, 6]. Для постановки реакции образцы тканей семенников, печени и селезенки замораживали при $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, получали криостатные срезы толщиной 20 мкм, которые монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизинном, подсушивали и покрывали желатиной для предупреждения неспецифического окрашивания. После этого срезы помещали в раствор, состоящий из 250 мг гидроксина и 100 мг ацетат серебра, растворенных в 100 мл 1М цитратного буфера ($\text{pH} = 3,8$). Время восстановления определяли экспериментально. В зависимости от толщины срезов экспозиция варьировала в диапазоне 10 — 30 минут. Для прерывания процесса восстановления стекла погружали в 5%-й раствор тиосульфата натрия на 10 минут. Промывали теплой проточной водой, докрашивали 0,1%-м раствором толуидинового синего, обезвоживали, просветляли и заключали в DEPEX.

В качестве позитивного контроля использовали препараты печени и селезенки — органов, способных накапливать НЧЗ. При микроскопическом исследовании наночастицы золота определялись в виде мелкодисперсных черных гранул.

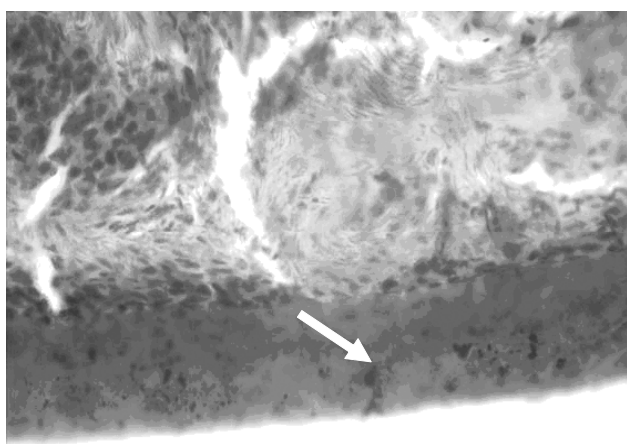
Иммуногистохимическая реакция на PCNA. Семенники фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида на 0,01М фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,4$) 24 часа при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, обезвоживали и заливали в парафин по стандартной методике. Полученные парафиновые срезы толщиной 5—7 мкм монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизинном («Menzel»). В качестве первичных

использовали моноклональные антитела к PCNA («Dako») в разведении 1 : 100. Для восстановления антигенной активности использовали высокотемпературную обработку ткани в миниавтоклаве «Pascal» при $T = 125\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 минут. Постановку иммуногистохимической реакции проводили с помощью полимерной системы визуализации по стандартному протоколу («Novocastra»). На заключительном этапе реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера. В качестве позитивного контроля к PCNA использовали препарат кожи. Негативным контролем служили срезы без инкубации с первичными антителами при полном соблюдении остальных этапов протокола. Темно-коричневый продукт реакции локализовался в ядрах пролиферирующих клеток.

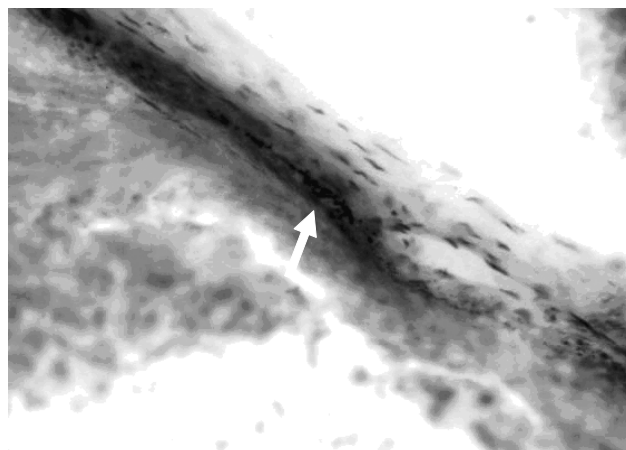
Результат реакции оценивали с помощью модифицированного индекса гонадотоксичности [3]. Для этого подсчитывали соотношение радиальных семенных канальцев с PCNA-позитивными сперматогониями и сперматоцитами к их общему количеству, в среднем по 50 канальцев на животное. Результат подсчета выражали в процентах. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При AMG-исследовании у животных I опытной группы было выявлено диффузное накопление НЧЗ в оболочке семенников, у II группы НЧЗ располагались в виде прослойки внутри оболочки (рис. 1). В паренхиме семенников наночастицы обнаружены не были. В печени наночастицы золота были выявлены в небольших количествах в основном в купферовских клетках. В селезенке следовые количества НЧЗ присутствовали в маргинальной зоне на границе красной и белой пульпы.



А

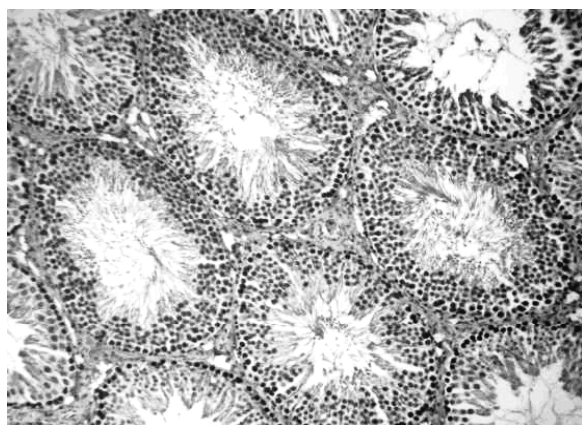


Б

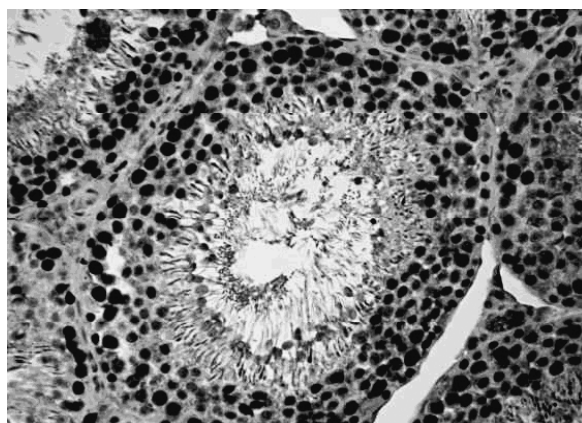
Рис. 1. Накопление частиц нанозолота (указано стрелкой) в оболочке семенников. А — I группа, Б — II группа. AMG-метод по Hacker. Исходное увеличение $\times 400$

Иммуногистохимический анализ показал экспрессию PCNA в ядрах сперматогоний и сперматоцитов интактных животных (рис. 2 А и Б), что соответствует литературным данным [9, 10]. У животных I опытной группы, получавших НЧЗ 5 нм в течение 8 недель, было выявлено снижение на 11 % количества семенных ка-

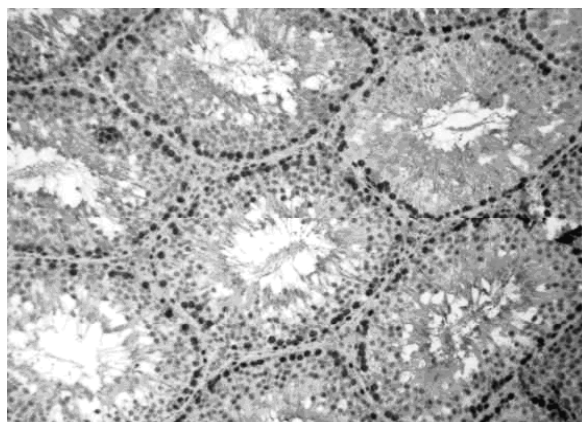
нальцев (рис. 3) с высокой активностью PCNA в сперматогенном эпителии (рис. 2 В и Г). Еще большие изменения наблюдались у крыс II опытной группы, где количество семенных канальцев с PCNA-позитивными сперматоцитами снижалось на 20 % по отношению к контролю (рис. 3). При этом сперматогонии оставались



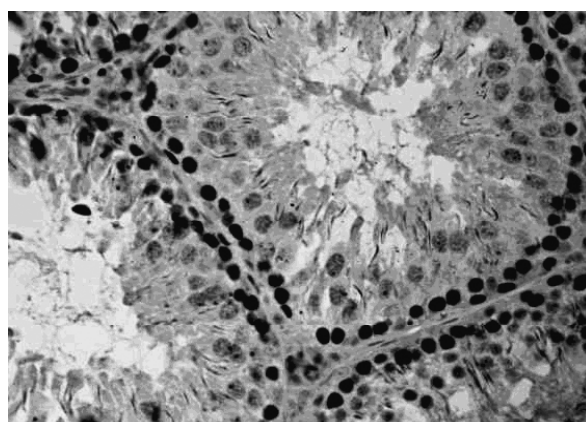
А



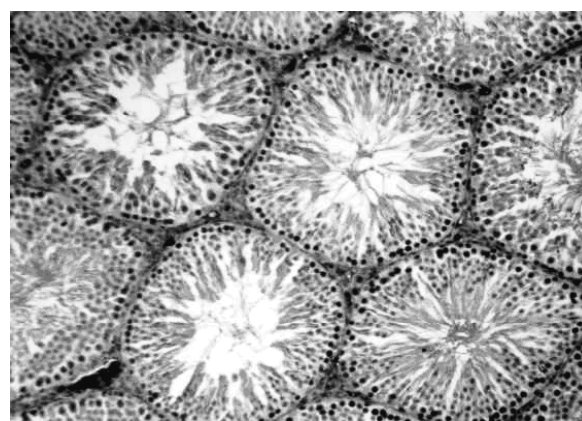
Б



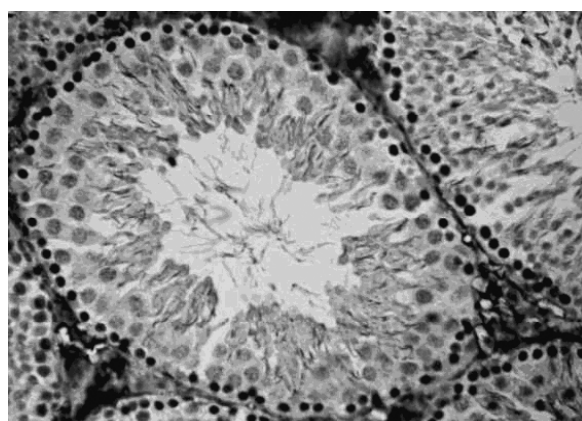
В



Г



Д



Е

Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция на PCNA в семенниках интактных самцов (А и Б) и в опытной группе (В и Г — НЧЗ диаметром 20 нм, Д и Е — НЧЗ диаметром 5 нм). Ядра иммунопозитивных половых клеток имеют черное окрашивание. Рис. А, В, Д — исходное увеличение $\times 100$; рис. Б, Г, Е — исходное увеличение $\times 200$

иммунопозитивными, а в сперматоцитах I и II порядка экспрессия PCNA отсутствовала.

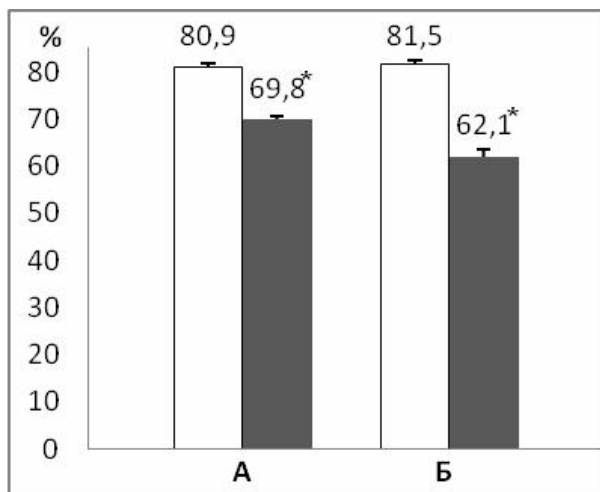


Рис. 3. Количество семенных канальцев с PCNA-положительными сперматогониями и сперматоцитами (в % %).

А — опытная группа I, Б — опытная группа II.
Светлые столбики — контроль, темные столбики — опыт

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при пероральном введении ЧНЗ в семенниках подопытных животных накопление наночастиц размером 5 и 20 нм регистрировали методом аутометаллографии только в соединительнотканной оболочке органа, но не в паренхиме. В то же время происходило подавление экспрессии PCNA — фактора пролиферации и дифференцировки клеток на уровне перехода половых клеток от сперматогониев к сперматоцитам I порядка, следствием чего может являться незавершенный сперматогенез. Из представленных данных можно заключить, что по резуль-

татам аутометаллографического исследования ЧНЗ размером 5 и 20 нм не могут преодолеть гемато-тестикулярный барьер, однако обладают репродуктивной токсичностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дыкман Л. А., Богатырев В. А., Щеголев С. Ю., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы: синтез свойства, биомедицинское применение. — М.: Наука, 2008. — 319 с.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, проф. Р. У. Хабриева. — М.: ОАО «Медицина», 2005. — 832 с.
3. D'Andrea M. R., Lawrence D., Nagele R. G., et al. // *Biotech. Histochem.* — 2008. — Vol. 83(5). — P. 211—220.
4. Danscher G., Norgaard J. O. // *J. Histochem. Cytochem.* — 1983. — Vol. 31 (12). — P. 1394—1398.
5. Hacker G. W., Grimelius L., Danscher G., et al. // *J. Histochem. Cytochem.* — 1988. — Vol 11 (4). — P. 213—221.
6. Hacker G. W., Jiang Gu. *Gold and Silver Staining: Techniques in Molecular Morphology.* — USA: Boca Raton, 2002. — 246 p.
7. Ivanov I., Chapados B. R., McCammon J. A., et al. // *Nucleic Acids Research.* — 2006. — Vol. 34 (20). — P. 6023—6033.
8. Kanter M., Aktas C., Erboga M. // *Food and chemical toxicology.* — 2012. — Vol. 50 (3—4). — P. 719—725.
9. Koh P. O., Kim M. O. // *J. Vet. Med. Sci.* — 2006. — Vol. 68 (10). — P. 1013—1017.
10. Schlatt S., Weinbauer G. F. // *Int. J. Androl.* — 1994. — Vol. 17(4). — P. 214—222.

Контактная информация

Почепцов Александр Яковлевич — зав. лабораторией патоморфологии ФГУП Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии ФМБА России, e-mail: pochepcov@rihtop.ru.