*Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки*
*Серія: Біологічні науки, 2018, 4(377)*

УДК 612.017.616.36: 612.621.1: 615.27: 611.018

# Вплив уведення наночастинок срібла на ооцити й клітини їх фолікулярного оточення в умовах експериментального гломерулонефриту

**Тетяна Вознесенська, Марія Ступчук, Оксана Калейнікова, Валентина Срібна, Тарас Блашків**

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАНУ, Київ, Україна
Адреса для листування: : tblashkiv@gmail.com

Отримано: 12.03.2018; прийнято до друку: 12.04.2018; опубліковано : 15.06.2018

**Резюме.** Наші нанотехнології й наномедицина швидко розвиваються в пошуках нових ліків. Препарати на основі наночастинок срібла (НЧС) серед них займають лідируюче становище. Стають актуальними дослідження, спрямовані на оцінку впливу різних доз і розмірів НЧС на жіночу репродуктивну систему у тварин. Такі дослідження нададуть нові дані, які будуть сприяти більш повному розумінню механізмів дії НЧС в лабораторних умовах, а також забезпечать успішний перехід нанотехнологій срібла в клініку. Отже, вплив НЧС на клітини і тканини ссавців вимагає подальшого вивчення.

Мета цього дослідження – оцінити вплив внутрішньовенного введення наночастинок срібла на функціональний стан яєчника у мишей, а саме на ооцити (їх кількість і мейотичене дозрівання) і на клітини їх фолікулярного оточення (кількість живих і з морфологічними ознаками апоптичної і некротичної загибелі) в умовах експериментального гломерулонефриту.

Експериментальний гломерулонефрит у мишей отримували імунізацією білих лабораторних мишей першого покоління суспензією антигену нирки, отриманої від попереднього покоління. Уведення проводили таким чином: антиген нирки – внутрішньобрюшинно три рази 1 раз в день; процедуру повторювали через три тижні, один раз внутрішньобрюшинно тією самою дозою (10 мкл суспензії на 10 г ваги). Наночастки срібла (30 нм) - внутрішньовенно три рази: 1 раз в день за 1 годину до імунізації тварин суспензією антигену нирки; а також через три тижні в тій самій дозі (2 мг / кг).

Встановлено, що кількість ооцитів, що відновлювали мейоз in vitro у тварин в умовах експериментального гломерулонефриту, зменшується, порівнянні з такою кількістю у контрольних тварин; в умовах введення НЧС не виявлено пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів; уведення НЧС в умовах експериментального гломерулонефриту збільшує кількість ооцитів, що відновлюють мейоз in vitro, порівняно з такими величинами в контролі і в умовах експериментального гломерулонефриту, а також збільшується кількість живих клітин і зменшується кількість клітин із морфологічними ознаками апоптозу в фолікулярному оточенні ооцитів.

**Ключові слова:** жіноча репродукцівная система, функціональний стан яєчника, нанотехнології, наномедицина.


© Вознесенська Т., Ступчук М., Калейнікова О., Срібна В., Блашків Т., 2018

# Effect of Intravenous Treatment of Silver Nanoparticles on Oocytes and Cells of their Follicular Environment under Conditions of Experimental Glomerulonephritis

**Tatyana Voznesenskaya, Maria Stupchuk, Oksana Kaleinikova, Valentina Sribna, Taras Blashkiv**

Bogomoletz Instytute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
Correspondence: tblashkiv@gmail.com

**Resume.** Nowadays, biomedical nanotechnology and nano medicine develops rapidly in the search for new drugs. Among them drugs based on silver nanoparticles (AgNPs) occupy the leading position. Studies that assess the effect of different doses and the multiplicity of the introduction of various sizes of AgNPs on reproduction of female animals gain topicality. Such studies will provide new data that will contribute to a fuller understanding of AgNPs mechanisms of action in the laboratory as well as provide a successful transition of silver nanotechnology into the clinics. Hence, the effect of AgNPs on mammalian cells and tissues requires further research.

The aim of the given study was to estimate the effect of intravenous treatment of silver nanoparticles on the functional state of the ovary in mice, namely oocytes (ovarian and meiotic maturation) and cells of their follicular environment (number of live, with morphological signs of apoptotic and necrotic death), under conditions of experimental glomerulonephritis.

Experimental glomerulonephritis in mice was achieved by immunization of white laboratory mice of the first generation with a kidney antigen suspension derived from a parent. The treatment was carried out the following way: kidney antigen Suspension - intraperitoneal three times 1 time per day; the procedure was repeated in 3 weeks, one time intraperitoneally with the same dose (10 mkL of suspension per 10 grams of body weight of the animal). Silver nanoparticles (AgNPs, 30 nm) – intravenous three times: 1 time per day for 1 hour before immunization of animals with suspension of kidney antigen; as well as in 3 weeks once with the same dose (2 mg/kg).

Thus, the number of oocytes that resume meiosis *in vitro* from animals under experimental glomerulonephritis decreases comparing to the numbers in control animals; no inhibition of meiotic resumeption of oocytes of animals was established under conditions of AgNPs treatment; the AgNPs treatment under conditions of experimental glomerulonephritis increases the number of oocytes that resume meiosis *in vitro* compared with such values in the control and under conditions of experimental glomerulonephritis as well as the number of living cells increases and the number of cells with morphological signs of apoptotic death decreases in the follicular environment of oocytes.

**Key words:** female reproduction, functional state of the ovary, nanotechnology, nanomedicine.

## Вступ

Наномедицина й нанофармакологія розвиваються високими темпами в пошуку нових лікарських засобів. Провідне місце серед них займають препарати на основі наночастинок срібла (НЧС). Широкий спектр антимікробної активності НЧС є сьогодні основним напрямом розвитку продуктів НЧС, уключаючи текстиль, контейнери для зберігання продуктів харчування, антисептичні спреї, катетери та пов'язки.

Останнім часом НЧС привертають особливу увагу через їх можливі терапевтичні застосування, такі як їх багатообіцяюча роль як протипухлинних агентів [1]. Незважаючи на багато-обіцяючий потенціал для застосування в медицині, вплив НЧС до їх широкого використання на здоров'я людини (як позитивне, так і негативне) усе ще не є повністю зрозумілим.

Гломерулонефрит, зокрема імунної етіології, являє собою серйозну проблему

для репродуктивного здоров'я жінок. Так, наявні дані про значний відсоток передчасних пологів та перинатальних утрат плода у пацієнток із мембранозним гломерулонефритом та IgA-гломерулонефритом, а також про те, що в 90 % жінок із мембранозним гломерулонефритом спостерігаємо народження здорових дітей [2]. Репродуктивна функція може бути порушена як самим гломерулярним захворюванням, так і внаслідок глюкокортикоїдної цитостатичної терапії. На сьогодні дані про вплив уведення НЧС на функціональний стан яєчника в умовах експериментального гломерулонефриту відсутні.

Тому актуальні дослідження, у яких буде проведено оцінку впливу різних доз, способу, кратності введення різного розміру наночастинок срібла на функціональний стан яєчника з використанням самок тварин, а саме на ооцити й клітини їх фолікулярного оточення, що надасть нові дані, які сприятимуть успішному переходу нанотехнології срібла в клініку, що вимагає розробки безпечних, економічно ефективних і екологічно чистих препаратів НЧС, а також більш повного розуміння механізмів їх дії в умовах лабораторних і клінічних випробувань.

**Мета роботи** – оцінити вплив внутрішньовенного введення наночастинок срібла на функціональний стан яєчника в мишей, а саме на ооцити (кількість у яєчнику й мейотичне дозрівання) і на клітини фолікулярного оточення ооцитів (кількість живих, із морфологічними ознаками апоптотичної та некротичної загибелі), в умовах експериментального гломерулонефриту.

## Матеріали та методи досліджень

*Тварини.* Досліди проводили з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження (від 21.02.2006 р.) та принципів «Міжнародної Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

*Експериментальний гломерулонефрит* у мишей досягався імунізацією білих лабораторних мишей I покоління суспензією антигену нирки, отриманої від материнської особи. Імунізацію тварин проводили з розрахунку 10 мкл суспензії на 10 грамів маси тіла за такою схемою: 3-разове внутрішньочеревне один раз на добу; повторно імунізацію проводили через три тижні одноразово внутрішньочеревно в тій самій дозі.

Перед початком і під час експерименту оцінювали об'єктивний статус тварин (зовнішній вигляд, загальну рухову активність, потребу в їжі та воді, двічі на тиждень визначали масу тіла); видільну функцію нирок (за кількістю спонтанних сечовиділень за добу, у разовій порції сечі, використовуючи тест-смужки визначали білок (діагностичні тест-смужки Citolab для швидкого виявлення білка, «Фармаско», Україна).

Дослідження проведено з використанням 24 самиць білих лабораторних ишей (масою 20–22 г). Тварин розділено на чотири групи: I – контрольна (n=6) – уводили фізіологічний розчин (0,3 мл), II – експериментальна 1 – тварини, імунізовані антигенною суспензією нирки (n=8). III – експериментальна, 2 – тваринам, імунізованим антигенною суспензією нирки, уводили субстанцію наночастинок срібла (n=8). IV – експериментальна, 2 – тваринам уводили субстанцію наночастинок срібла (2 мг/кг, 0,3 мл) (n=6).

Забір експериментального матеріалу (яєчники) здійснювали під ефірним наркозом на третій день після останнього введення. Із досліду тварин виводили з експерименту за допомогою перерізання спинного мозку під ефірним наркозом із дотриманням правил евтаназії.

*Уведення речовин проводили* суспензією антигену нирки – внутрішньочеревне тричі, один раз на добу; а також повторно через три тижні одноразово внутрішньочеревно в тій самій дозі (10 мкл суспензії на 10 грамів маси тіла тварини).

НЧС – внутрішньовенно (у хвостову вену) тричі один раз на добу за 1 год до імунізації тварин суспензією антигену нирки; а також через три тижні одноразово в тій самій дозі (2 мг/кг).

*Характеристика* наночастинки НЧС (AgNPs) – 30 нм (концентрація 8 мг/мл за металом, форма – сферична, колір – коричневий, реагенти використані для синтезу – нітрат срібла ($AgNO_3$), (BioXtra, >99 % (titration, Sigma-Aldrich); Карбонат калію ($K_2CO_3$) (99,995 % trace metals basis, Sigma-Aldrich); Танін (ACS reagent, Sigma-Aldrich), синтезовані в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України за оригінальним протоколом (методом хімічної конденсації).

Застосовані нами НЧС – наночастинки 30 нм ((концентрація: 8 мг/мл за металом, форма: сферична, колір – коричневий, реагенти використані для синтезу – нітрат срібла ($AgNO_3$), (BioXtra, >99 % (titration, Sigma-Aldrich); Карбонат калію ($K_2CO_3$) (99,995 % trace metals basis, Sigma-Aldrich); Танін (ACS reagent, Sigma-Aldrich), синтезовані в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України за оригінальним протоколом (методом хімічної конденсації).

*Культивування ооцитів.* Із яєчників мишей неферментативно (механічно) виділяли ооцити. Оцінювали стан зародкового пухирця, перивітелінового простору та цитоплазми, а саме щільність, ступінь гранульованості, ознаки фрагментації й дегенерації. Після 2 год культивування підраховували ооцити (% до загальної кількості), що перебували на стадії метафази I (розчинення зародкового пухирця), після 20 г культивування підраховували ооцити (% до загальної кількості), що перебували на стадії метафази II (сформованого першого полярного тільця), а також ооцити з атиповою морфологією (нерівномірно гранульованою цитоплазмою та ознаками фрагментації останньої).

*Метод прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками.* Шляхи клітинної загибелі (кумулюсних клітин і клітин тимуса й лімфатичних вузлів) вивчали методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Хехст 33342 та йодид пропідіума. Зв'язані з хроматином барвники дають змогу оцінити морфологічні особливості ядерного матеріалу. Оцінку проводили не менш як 400 клітин за допомогою люмінесцентного мікроскопа Люмам И–1 (ЛОМО, Росія) із водно-імерсійним об'єктивом х85 та з відеосистемою передачі зображення на комп'ютер.

*Статистична обробка даних.* Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента за допомогою програми GraphPad Prism version 5,00 for Windows (GraphPad Software, США); $p<0,05$ уважалося статистично вірогідним.

**Результати**

Установлено, що в умовах експериментального гломерулонефриту відбувається зменшення кількості оваріальних ооцитів, уведення НЧС не впливає на ооцити, застосування НЧС в умовах експериментального гломерулонефриту призводить до зростання кількості оваріальних ооцитів (табл. 1).

Установлено, що введення НЧС не впливає на ооцити, тоді як застосування таких НЧС в умовах експериментального гломерулонефриту призводить до зростання кількості ооцитів, що відновили мейоз (стадія метафази I) і формували перше полярне тільце (стадія метафази II), порівняно із середніми величинами у групі в умовах експериментального гломерулонефриту (рис.1).

*Таблиця 1*

**Кількість ооцитів, які виділяли з одного яєчника в умовах експериментального гломерулонефриту й уведення наночастинок срібла**

| **Кількість ооцитів/яєчник, *шт*** | | | |
|---|---|---|---|
| контроль | імун. | імун.+НЧС | НЧС |
| 17,3±0,6 | 9,8±1,3 * | 15,0 ± 0,8 # | 17,4 ± 1,2 |

Примітка. * – *p<0,05 – вірогідні відмінності середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі тварин (n=4); # - P<0,05 – вірогідні відмінності середніх груп даних відносно таких величин у групі тварин з експериментальним гломерулонефритом (n=4).*

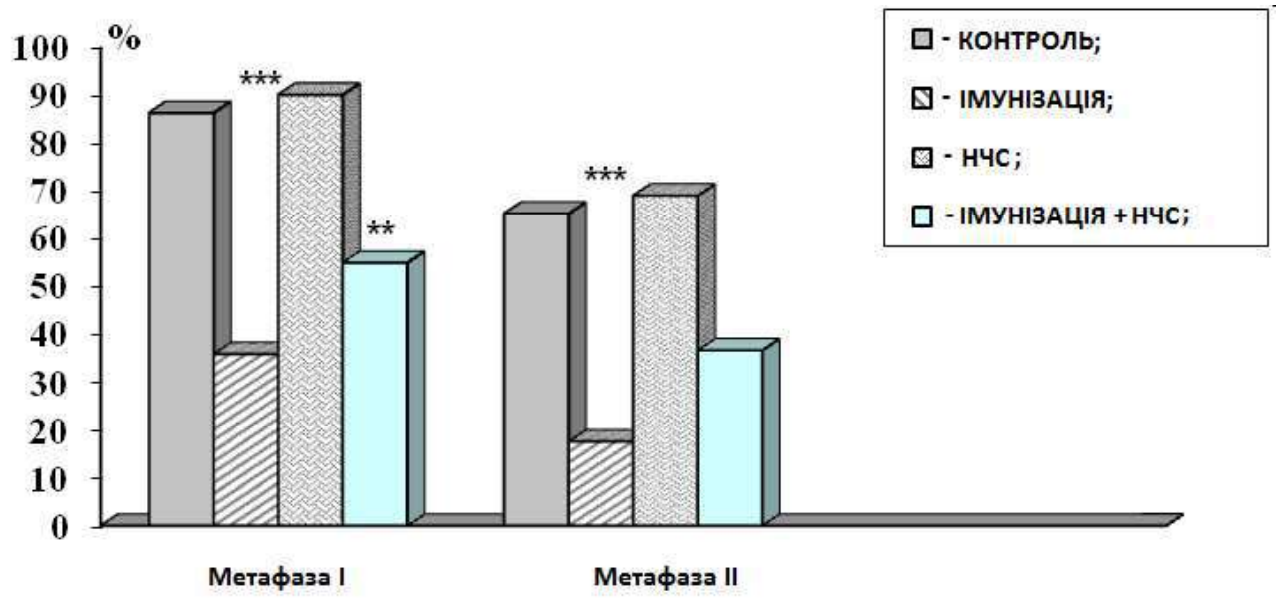


**Рис. 1.** *Вплив наночастинок срібла на мейотичне дозрівання ооцитів в умовах експериментального гломерулонефриту*

** - *P<0,01; *** - P<0,001; – вірогідні відмінності середніх груп даних відносно до таких величин у контрольній групі тварин (n=4).*

Установлено, що в умовах експериментального гломерулонефриту відбувається зменшення кількості живих клітин та збільшується кількість клітин із морфологічними ознаками апоптотичної та некротичної загибелі клітин у фолікулярному оточенні ооцитів; уведення НЧС в умовах експериментального гломерулонефриту призводить до збільшення кількості живих клітин і зменшення клітин із морфологічними ознаками апоптотичної загибелі клітин фолікулярного оточення ооцитів (табл. 2). Отже, в умовах експериментального гломерулонефриту введення НЧС покращує функціональний стан яєчника у тварин: збільшується кількість ооцитів, які відновлюють мейоз та формують перше полярне тільце *in vitro*, а також збільшується кількість живих клітин і

*Таблиця 2*

**Вплив уведення наночастинок срібла на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального гломерулонефриту**

| Група тварин | Живі, % | Апоптоз, % | Некроз, % |
|---|---|---|---|
| Контроль | 79,5 ± 0,7 | 12,5 ± 1,8 | 8,0 ± 07 |
| Імунізація | 41,8 ± 0,3** | 35,2 ±1,8** | 23,0 ± 1,4** |
| НЧС | 83,5 ± 0,1 | 10,8 ± 0,3 | 5,6 ±0,35 |
| Імунізація+ НЧС | 62,8 ±1,5*# | 19,5 ± 0,9*# | 17,7 ± 0,8** |

Примітка. * – *P<0,05;* ** –*P<0,01 – вірогідні відмінності середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі тварин (n=4);* # – *P<0,05 – вірогідні відмінності середніх груп даних відносно таких величин у групі тварин з експериментальним гломерулонефритом (n=4).*

зменшується чиселність клітин із морфологічними ознаками апоптотичної загибелі у фолікулярному оточенні ооцитів.

## Обговорення

За даними літератури відомо, що розвиток гломерулонефриту за імунним механізмом пов'язаний: а) із наявністю спільних перехресно-реагуючих антигенів мікроорганізмів (бактерій, вірусів та ін) й антигенів базальної мембрани клубочків; б) з інтенсивною появою на базальній мембрані гломерул антигенів головного комплексу гістосумісності (зокрема, HLA-DR2 і DR3 антигенів); в) із пошкодженням ниркової тканини і вивільненням прихованих антигенів або детермінант гломерулярної базальної мембрани, до яких немає толерантності [3]. Із метою дослідження імунних захворювань нирок і розробки тактики їх терапії використовують експериментальні моделі ушкодження нирок, що відображають особливості патогенезу різних варіантів цього захворювання [4, 5].

Маємо дані про внутрішньовенне (IV) введення AgNPs [6,7]. Для всіх розмірів частинок, незалежно від їх покриття, найвищі концентрації срібла знайдено в селезінці й печінці, а потім у легенях, нирках і в головному мозку через 24 години після внутрішньовенного введення; срібло фільтрується печінкою й виводиться з організму через жовч [6, 7]. Відомо, що доза 10 мг/кг ваги тіла в мишей еквівалентна для людини доза 0,81 мг/кг ваги тіла, що відповідає приблизно 50 мг для людини 60 кг, відповідно до основних принципів для перерахунку дози від тварин до людини [8]. Нами обрано дозу 2 мг/кг ваги тіла, оскільки вона не перевищує доз, які використовувалися в попередніх дослідженнях IV і не викликали значних побічних ефектів у тварин [6, 9, 10].

У літературі наявні дані щодо впливу наночастинок на ооцити. Маємо дані про реакцію *in vitro* кумулюсно-ооцитарних клітинних комплексів свині на наночастинки золота, срібла й сплаву

золото-срібло, укриті бичачим сироватковим альбуміном (БСА) [11]. Мейотичне дозрівання ооцитів оцінювали після 46 год культивування in vitro у присутності різних типів наночастинок, а також нітрату срібла в середовищі протягом усього часу *in vitro* дозрівання. Дозрівання в цьому випадку визначалося як відсоток ооцитів, що відображають метафазну пластинку й сформоване полярне тіло (другий поділ мейозу) по 350 ооцитів на кожну групу. Концентрація наночастинок становила 10 мкг/мл, і всі частинки були кон'юговані з бичачим сироватковим альбуміном (БСА) [11]. Раніше нами отримано дані про вплив одно-, п'яти- та десятикратного введення AgNPs (2 мг/кг та 4 мг/кг) на мейотичне дозрівання ооцитів [12]. Так, одно- й п'ятикратне введення AgNPs (2 мг/кг) не впливало на мейотичне дозрівання ооцитів; десятикратне введення AgNPs (2 мг/кг) викликає зменшення кількості ооцитів, здатних до формування першого полярного тільця (метафаза II) [12].

У цій роботі нами вперше показано, що в умовах експериментального гломерулонефриту введення НЧС покращує функціональний стан яєчника у тварин: збільшується кількість ооцитів, які відновлюють мейоз і формують перше полярне тільце *in vitro*, а також збільшується кількість живих клітин та зменшується чисельність клітин із морфологічними ознаками апоптотичної загибелі у фолікулярному оточенні ооцитів; не встановлено пригнічення овариальної функції у самок мишей в умовах уведення НЧС (2 мг/кг).

## Висновки

В умовах експериментального гломерулонефриту відбувається пригнічення овариальної функції; не встановлено пригнічення овариальної функції у самок мишей в умовах уведення НЧС (2 мг/кг); застосування чотирикратного введення НЧС (2 мг/кг) в умовах експериментального гломерулонефриту покращує функціональний стан яєчника: збільшується кількість ооцитів, які відновлюють мейоз та формують перше полярне тільце *in vitro*, а також збільшується кількість живих клітин і зменшується чисельність клітин з морфологічними ознаками апоптотичної загибелі у фолікулярному оточенні ооцитів.

Описані нами результати підтверджують, що in vitro дозрівання ооцитів є чутливою системою для досліджень, пов'язаних із нанотоксикологією. Використання таких тестових систем у майбутньому сприятиме поглибленню розуміння можливих ефектів наночастинок на жіночу репродукцію. Також майбутні дослідження можна спрямовувати на встановлення чітких специфікацій наночастинок (від дози, розміру) у відповідних експериментальних умовах.

## Література

1. Braun, G.; Friman, T.; Pang, H.; Pallaor, A.; de Mendoza, T.; Willmore, A.; Kotamraj, V.; Man, A.; She, Z.; Sugahar, K; Reich, N.; Teesalu, T.; Ruoslahti E. Etchable plasmonic nanoparticle probes to image and quantify cellular internalization. *Nat. Mater.* 2014, 13(9), pp 904–911.

2. Malik, G.; Al-Harbi, A.; Al-Mohaya, S.; Al-Wakeel, J.; Al-Hozaim, W.; Kechrid, M.; Shetia, M.; Hammed D. Repeated pregnancies in patients with primary membranous glomerulonephritis. *Nephron.* 2002, 91(1), pp 21–24.

3. Gilbert, S.; Weiner, D. National Kidney Foundation's Primer on Kidney Diseases. Elselvier, 2014, 6th edition, 592.

4. Пальцева, Е. М. Экспериментальные модели хронических заболеваний почек. *Клиническая нефрология* 2009, 2, с 37–42.

5. Коломеец, Н. Ю.; Аверьянова, Н. И.; Косарева П. В. Разработка модели хронического гломерулонефрита у белых нелинейных крыс. *Современные проблемы науки и образования* 2012, 3.

6. Xue, Y.; Zhang, S.; Huang, Y.; Zhang, T.; Liu, X.; Hu, Y.; Zhang, Z.; Tang M. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. *J. Appl. Toxicol.* 2012, 32, pp 890–899.

7. Recordati, C.; De Maglie, M.; Bianchessi, S.; Argentiere, S.; Cella, C.; Mattiello, S.; Cubadda, F.;

Aureli, F.; D'Amato, M.; Raggi, A.; Lenardi, C.; Milani, P.; Scanziani E. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects. *Part Fibre Toxicol.* 2015, 13, 12.

8. Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008, 22, pp 659–661.

9. Park, K.; Park, E.; Chun, I.; Choi, K.; Lee, S.; Yoon, J.; Lee B. Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Arch. Pharm. Res.* 2011, 34, pp 153–158.

10. De Jong, W.; Van Der Ven, L.; Sleijffers, A.; Park, M.; Jansen, E.; Lovere, H.; Vandebriel, R. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. *Biomaterials.* 2013, 13(34), pp 8333–8343.

11. Tiedemann, D.; Taylor, U.; Rehbock, Ch.; Jakobi, J.; Klein, S.; Kues, W.; Barcikowski, S.; Rath D. Reprotoxicity of gold, silver, and gold-silver alloy nanoparticles on mammalian gametes. *Analyst.* 2014, 139(5), pp 931–942.

12. Lytvynenko, A.; Rieznichenko, L.; Sribna, V.; Stupchuk, M.; Grushka, N.; Shepel, A.; Voznesenska, T.; Blashkiv, T.; Kaleynykova, O. Functional status of reproductive system under treatment of silver nanoparticles in female mice. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology.* 2017, 6(5), pp 1713–1720.