

А. О. Прискока

Дослідження гострої токсичності наночастинок срібла за внутрішньоочеревинного введення

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

Ключові слова: наночастинок срібла,
гостра токсичність, миші

Срібло є одним із найактивніше досліджуваних металів у нанорозмірному діапазоні. Відоме своєю протимікробною активністю ще із стародавніх часів [1], срібло, у формі наночастинок відкриває нові можливості для лікування інфекційних хвороб, у тому числі викликаних антибіотикорезистентними штамми мікроорганізмів. Тим не менш у світовій літературі недостатньо даних щодо токсичності наночастинок срібла (НЧС). Дослідження, в основному, обмежуються даними цитотоксичності на культурах клітин, однак для впровадження НЧС як лікарський засіб необхідна оцінка впливу на цілісний організм. Нечисленні дослідження гострої токсичності при пероральному способі введення наночастинок срібла на мишах [2], щурах [3], а також при нашкірному введенні морським свинкам [4], щурам [3, 5] та кроликам [3] виявили низьку токсичність НЧС. У роботі [6], де спосіб введення був внутрішньовенний, а НЧС стабілізовані ПАР, показник LD_{50} був надзвичайно низький, що свідчить про високу токсичність досліджуваних авторами НЧС. Ці дані літератури настановлюють на думку, що наночастинок срібла залежно від форми, способу введення, розмірів та інших параметрів мають різний токсикологічний профіль.

На кафедрі фармакології та клінічної фармакології НМУ імені О. О. Богомольця протягом останніх 15 років проводяться дослідження з вивчення фармакологічних і токсикологічних властивостей нанометалів: срібла, міді, заліза [8–10].

Мета роботи – дослідження гострої токсичності НЧС.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження був колоїдний розчин НЧС (діаметр 30 нм, сферична форма), синтезованих за оригінальною методикою в Інституті біологічної хімії, у концентрації 1080 мг/мл. Розмір наночастинок обчислювали з використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС). Вимірювання проводили на лазерно-кореляційному спектрометрі Zetasizer-3 («Malvern Instruments Ltd», Великобританія). Розмір та форма наночастинок також підтверджені за допомогою електронно-трансмісійної мікроскопії (JEM-1230, «JEOL», Японія). У попередніх дослідженнях [11] було виявлено відсутність генотоксичного ефекту *in vivo* та *in vitro*, мутагенної дії даних наночастинок. Гостру токсичність НЧС досліджували на самках та самцях мишей лінії BALB/c, було обрано внутрішньоочеревинний спосіб введення, як один із шляхів, що забезпечує системний вплив [12]. У дослідження взято 56 самок та 56 самців мишей лінії BALB/c (вага 20 ± 2 г), яких було розподілено на 8 груп по 7 особин (7 дослідних груп, що отримували НЧС у діапазоні доз 15–45 мг/кг у перерахунку на металічне срібло, та одна контрольна). Усіх тварин утримували за стандартних умов віварію Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Дослідження проводили відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» [13].

Дослідні групи розподілили відповідно до рівнів доз (15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 35 мг/кг, 40 мг/кг, 45 мг/кг). Тваринам контрольної групи вводили воду для ін'єкцій (виробник –

ЗАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця»). Протягом перших 48 год після введення досліджуваної речовини спостерігали за смертністю, поведінкою тварин. За тваринами спостерігали протягом наступних 14 діб після введення. Зважування виконували безпосередньо перед уведенням, на 7 та 14 добу експерименту. Після закінчення дослідження тварини були виведені з експерименту шляхом шийної дислокації. Усі тварини підлягали розтину, у них були вилучені внутрішні органи для подальших досліджень (печінка, нирки, селезінка, серце, легені, головний мозок) та виконані відповідні статистичні розрахунки LD_{50} . Визначення LD_{50} , а також графічне відображення результатів проводили за допомогою програми BioStat 2009 v 5.8.4. (виробник – Analyst Soft), обраний метод розрахунку – пробіт-аналіз за Finney. Дослідження проводили відповідно до вітчизняних [12] та зарубіжних рекомендацій [14].

Результати та їх обговорення. *Спостереження за тваринами.* У перші

хвилини після введення досліджуваного препарату спостерігали пригнічення рухової активності в усіх експериментальних тварин. У самок з груп № 3 та № 5 (15 та 35 мг/кг відповідно) спостерігали «корчі» (тварини рухались, характерно вигинаючи тулуб, та волочили задні лапи), що свідчить про сильне подразнення органів черевної порожнини досліджуваним препаратом. У мишей обох статей з груп № 6 та 7 (дози 40 та 45 мг/кг відповідно) спостерігали гіперемію вух. Загибель тварин спостерігали здебільшого в перші 24 год експерименту. Відновлення рухової активності та апетиту в піддослідних мишей, що вижили, відбувалося через 24–48 год після введення препарату. У контрольній групі тварин відхилень від норми не відмічено. У всіх досліджуваних групах тварин, окрім самців групи № 2, спостерігали позитивну динаміку набору ваги (табл. 1).

Результати розтину. При розтині в усіх мишей дослідних груп виявлена виражена гіперемія очеревини та кишківника. Розвиток асептичного запа-

Таблиця 1

Динаміка маси тіла мишей за внутрішньоочервинного введення наночасток срібла, г ($M \pm m$)

Група тварин, (доза)	Маса тварин, г		
	Вихідні дані	7 доба	14 доба
<i>Самці</i>			
№ 1 (15 мг/кг)	20,27 ± 1,43*	24,27 ± 2,87*	25,98 ± 2,34*
№ 2 (20 мг/кг)	20,64 ± 0,97*	24,58 ± 2,62**	19,94 ± 2,79**
№ 3 (25 мг/кг)	20,67 ± 1,48*	26,58 ± 1,80***	21,40 ± 3,55***
№ 4 (30 мг/кг)	19,96 ± 1,55*	24,40 ± 1,30****	24,15 ± 2,19****
№ 5 (35 мг/кг)	19,67 ± 0,68*	21,43 ± 4,57***	22,78 ± 5,83***
№ 6 (40 мг/кг)	20,66 ± 1,43*	28,23 ± 1,57****	28,35 ± 0,26****
№ 7 (45 мг/кг)	19,71 ± 1,48*	-	-
Контроль (вода для ін'єкцій)	18,26 ± 0,20*	21,34 ± 2,09*	22,18 ± 2,42*
<i>Самки</i>			
№ 1 (15 мг/кг)	19,73 ± 2,09*	21,50 ± 1,59***	23,02 ± 3,39***
№ 2 (20 мг/кг)	19,33 ± 1,25*	22,12 ± 2,08***	22,86 ± 2,41***
№ 3 (25 мг/кг)	19,51 ± 1,36*	21,70 ± 2,14****	21,00 ± 2,83****
№ 4 (30 мг/кг)	19,51 ± 1,36*	-	-
№ 5 (35 мг/кг)	18,36 ± 0,63*	-	-
№ 6 (40 мг/кг)	19,76 ± 1,14*	-	-
№ 7 (45 мг/кг)	19,76 ± 1,41*	-	-
Контроль (вода для ін'єкцій)	18,54 ± 2,64*	20,99 ± 2,79*	21,37 ± 2,64*

Примітка. n – кількість тварин у групі на час зважування; *n = 7; **n = 6; ***n = 5; ****n = 4.

лення в черевній порожнині міг стати однією з причин загибелі піддослідних тварин. Відмічена світла зернистість печінки може свідчити про гепатотоксичний вплив уведеної речовини. У мишей, яким вводили дози, вищі за 25 мг/кг, виявлений чорний осад на внутрішній стороні очеревини, що, скоріш за все, являє собою окислені спо-

луки срібла. Масові коефіцієнти внутрішніх органів (печінки, нирок, селезінки, серця, легень, головного мозку) відображені в таблиці 2. Слід відзначити суттєве збільшення масового коефіцієнта печінки в дослідних групах самців, що свідчить про можливість негативного впливу уведеної субстанції на цей орган.

Таблиця 2

Масові коефіцієнти внутрішніх органів мишей за внутрішньоочеревинного введення наночастинок срібла ($M \pm m$)

Група тварин, (доза)	Маса тварин, г					
	печінка	нирка	селезінка	легені	серце	головний мозок
<i>Самці</i>						
№ 1 (15 мг/кг)	5,24 ± 0,78	0,83 ± 0,03*	0,72 ± 0,08*	1,35 ± 0,03*	0,61 ± 0,03*	1,72 ± 0,03*
№ 2 (20 мг/кг)	7,17 ± 0,40*	1,10 ± 0,04	0,89 ± 0,04*	1,89 ± 0,07*	0,89 ± 0,04*	2,65 ± 0,07*
№ 3 (25 мг/кг)	7,70 ± 0,31*	1,34 ± 0,21*	1,11 ± 0,06	1,98 ± 0,04*	0,94 ± 0,06*	2,24 ± 0,08
№ 4 (30 мг/кг)	9,46 ± 1,15*	1,36 ± 0,27	1,26 ± 0,18*	1,40 ± 0,93*	1,01 ± 0,14	2,63 ± 0,28*
№ 5 (35 мг/кг)	6,75 ± 1,42	0,77 ± 0,04*	0,69 ± 0,14*	1,61 ± 0,10	0,65 ± 0,08*	2,24 ± 0,06
№ 6 (40 мг/кг)	6,90 ± 2,07	0,93 ± 0,23	0,78 ± 0,21*	1,00 ± 0,02*	0,74 ± 0,26*	2,08 ± 0,62
№ 7 (45 мг/кг)	10,93 ± 0,25*	1,11 ± 0,01*	1,03 ± 0,02	2,14 ± 0,15*	1,37 ± 0,04*	3,21 ± 0,15*
Контроль (вода для ін'єкцій)	6,34 ± 0,19	1,10 ± 0,10	1,19 ± 0,34	1,60 ± 0,30	1,01 ± 0,09	2,21 ± 0,16
<i>Самки</i>						
№ 1 (15 мг/кг)	6,52 ± 0,28*	0,63 ± 0,01*	0,96 ± 0,12*	1,53 ± 0,01	0,86 ± 0,08	2,16 ± 0,11*
№ 2 (20 мг/кг)	6,24 ± 0,55*	0,52 ± 0,07*	0,60 ± 0,10*	1,48 ± 0,06	0,49 ± 0,03*	2,22 ± 0,10*
№ 3 (25 мг/кг)	7,24 ± 1,29*	0,67 ± 0,12*	0,88 ± 0,01*	1,72 ± 0,06*	0,73 ± 0,16*	2,11 ± 0,08*
№ 4 (30 мг/кг)	6,62 ± 0,03*	0,75 ± 0,01*	0,65 ± 0,04*	1,27 ± 0,02*	0,57 ± 0,01	2,06 ± 0,03*
№ 5 (35 мг/кг)	8,41 ± 0,66	0,78 ± 0,01*	1,29 ± 0,10*	1,66 ± 0,01*	0,67 ± 0,05	2,29 ± 0,01
№ 6 (40 мг/кг)	9,11 ± 0,45*	0,74 ± 0,04*	0,84 ± 0,05*	1,56 ± 0,20	0,64 ± 0,03	2,50 ± 0,18*
№ 7 (45 мг/кг)	8,15 ± 0,62	0,76 ± 0,05	0,79 ± 0,13	1,31 ± 0,02	0,81 ± 0,12*	2,54 ± 0,01*
Контроль (вода для ін'єкцій)	8,63 ± 0,07	0,82 ± 0,04	0,76 ± 0,03	1,44 ± 0,10	0,76 ± 0,03	2,63 ± 0,29

Примітка. n = 4–7. *статистично достовірно порівняно з контролем, p < 0,05.

Таблиця 3

*Загибель самців та самок мишей
BALB/c за внутрішньоочеревинного
введення наночастинок срібла*

Група тварин, №	Доза, мг/кг	Кількість загиблих тварин	Загальна кількість тварин у групі
<i>Самці</i>			
1	15	0	7
2	20	1	7
3	25	2	7
4	30	3	7
5	35	2	7
6	40	3	7
7	45	7	7
<i>Самки</i>			
1	15	2	7
2	20	2	7
3	25	3	7
4	30	6	7
5	35	6	7
6	40	7	7
7	45	7	7

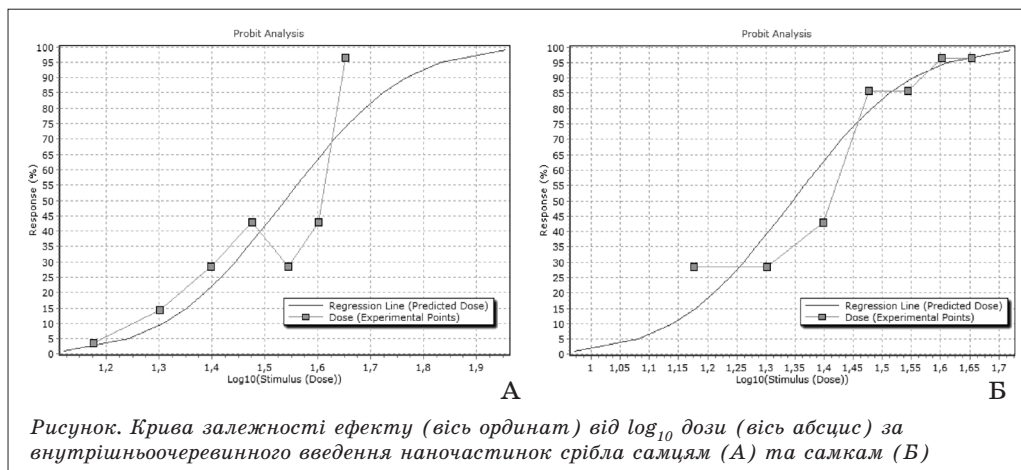
Розрахунок LD_{50} . Дані щодо смертності тварин підсумовано в таблиці 3. Криві залежності доза-ефект для самців та самок зображені на рисунку. Статистична обробка первинних даних виявила, що LD_{50} для самок є нижчою ніж для самців ($22,17 \pm 2,36$ мг/кг та $34,53 \pm 3,87$ мг/кг відповідно, $p = 0,05$), що може свідчити про більшу чутливість самок до досліджуваного розчину срібла. Отримані дані з визначення LD_{50} дозволяють віднести дослі-

джувані наночастинки до III класу токсичності й характеризувати їх як «помірно токсичні сполуки» [12].

Отримані дані свідчать про те, що НЧС можуть бути токсичними при парентеральному застосуванні. Як показало наше дослідження, при внутрішньоочеревинному введенні високих доз НЧС спостерігається їхня подразнююча дія на очеревину та внутрішні органи, що проявляється характерним симптомом (корчі), змінами внутрішніх органів (гіперемія очеревини, кишківника), які свідчать про розвиток запалення. До того ж, відзначені зміни печінки дослідних тварин (поява світлої зернистості, збільшення маси печінки) можуть свідчити про гепатотоксичність досліджуваних наночастинок срібла. Дані літератури щодо гендерних особливостей токсичної дії НЧС відсутні. Тим не менш, у статтях [15–17] наводяться гендерні особливості кумуляції НЧС. Так, зокрема, відмічається більше накопичення НЧС у нирках самок порівняно із самцями, які, утім, не призводили до видимих негативних наслідків.

Висновки

1. Внутрішньоочеревинне введення наночастинок срібла в колоїдному розчині самцям і самкам мишей BALB/c виявило, що LD_{50} для самців і самок становлять $34,53 \pm 3,87$ мг/кг та $22,17 \pm 2,36$ мг/кг ($p = 0,05$) відповідно, розраховані за методом пробіт-аналізу Finney, що дозволяє віднести досліджувані наночастинки срібла до III класу токсичності «Помірно токсичні сполуки».



2. Суттєві відмінності в значеннях LD_{50} для самців та самок свідчать про залежність гострої токсичності від статі та більшу чутливість самок до наночастинок срібла за обраного шляху введення.

3. Спостереження за поведінкою тварин, а також результати розтину свідчать про виражену подразнюючу дію колоїдного розчину НЧС за внутрішньоочеревинного введення.

1. Alexander J. W. History of the medical use of silver / Alexander J. W. – Surgical infections. – 2009. – V. 10. – № 3. – P. 289–299.
2. An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles / P. Maneewattanapinyo, W. Banlunara, C. Thammacharoen [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 2011. – V. 73. – P. 1417–1423.
3. Kim J. S., Song K. S., Sung J. H. [et al.] // Nanotoxicology. – 2013. – V. 7, № 5. – P. 953–960.
4. Korani M., Rezayat S. M., Gilani K. [et al.] // Int. J. Nanomedicine. – 2011. – V. 6. – P. 855–862.
5. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use / Jain J, Arora S, Rajwade J. M. [et al.] // Mol. Pharm. – 2009. – V. 6. – № 5. – P. 1388–1401.
6. Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice in vivo / G. Ordzhonikidze, L. K. Ramaiyya, E. M. Egorova [et al.] – Acta naturae – 2009. – № 3. – P. 99–101.
7. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles / Sung J. H., Ji J. H., Park J. D. [et al.]. – Toxicological sciences. – 2009. – V. 108. – № 2 – P. 452–461.
8. Нанонаука і нанотехнології: технічний, медичний і соціальний аспекти / Б. Є. Патон, В. Ф. Москаленко, І. С. Чекман, Б. О. Мовчан // Вісник Національної академії наук України. – 2009. – № 6. – С. 76–80.
9. Чекман І. С. Нанофармакологія / І. С. Чекман. – К. : Задруга, 2011. – 424 с.
10. Чекман І. С. Природні наноструктури та наномеханізми / І. С. Чекман, П. В. Симонов. – К. : Задруга, 2012. – 104 с.
11. Дослідження наночастинок срібла за критеріями генотоксичності, мутагенності та впливу на штами-пробіонти шлунково-кишкового тракту людини та тварин / Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, А. О. Прискока [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 3. – С. 40–46.
12. Доклінічні дослідження лікарських засобів / гол. ред. О. В. Стефанов. – К. : Авіценна, 2001. – С. 59–90.
13. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145.
14. United States Environmental Protection Agency OPPTS 885.3200 Acute Injection Toxicity / Pathogenicity // Microbial Pesticide Test Guidelines. – 1996. – P. 1–6.
15. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice / Y. Xue, S. Zhang, Y. Huang [et al.] // J. Appl. Toxicol. – 2012. – V. 32, № 11. – P. 890–899.
16. Kim W. Y. Histological study of gender differences in accumulation of silver nanoparticles in kidneys of Fischer 344 rats / W. Y. Kim, J. Kim, J. D. Park // J. Toxicol. Environ. Health. A. – 2009. – V. 72, № 21–22. – P. 1279–1284.
17. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles / Sung J. H., Ji J. H., Park J. D. [et al.] // Toxicological sciences. – 2009. – V. 108. – № 2 – P. 452–461.

А. О. Прискока

Дослідження гострої токсичності наночастинок срібла за внутрішньоочеревинного введення

Наночастки срібла є перспективними для впровадження як ефективного протимікробного засобу. Проте маловивченим є токсикологічний аспект. Мета дослідження – вивчення гострої токсичності наночастинок срібла за внутрішньоочеревинного введення. Встановлено, що дані наночастинки при введенні мишам лінії BALB/c можуть бути віднесені до III класу токсичності «Помірно токсичні сполуки». Спостереження за тваринами, а також результати розтину виявили, що дані наночастинки мають виражену подразнюючу дію за даного способу введення. Також встановлена суттєва різниця LD_{50} для самців і самок, що свідчить про статевозалежні особливості токсичної дії наночастинок срібла. Ці факти необхідно враховувати при розробці парентеральної форми введення.

Ключові слова: наночастинки срібла, гостра токсичність, миші

А. О. Прискока

Исследование острой токсичности наночастиц серебра при внутрибрюшинном введении

Наночастицы серебра являются перспективными для внедрения как эффективного противомикробного средства. Тем не менее, малоизученным является токсикологический аспект. Цель исследования – изучение острой токсичности наночастиц серебра при внутрибрюшинном введении. Установлено, что данные наночастицы при внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c могут быть отнесены к III классу токсичности «Умеренно токсичные соединения». Наблюдение за животными, а также результаты вскрытия выявили, что данные наночастицы обладают выраженным раздражающим действием при данном способе введения. Также установлена существенная разница LD_{50}

для самцов и самок, что свидетельствует о зависимости токсического действия наночастиц серебра от пола. Эти факты необходимо учитывать при разработке парентеральной формы введения.

Ключевые слова: наночастицы серебра, острая токсичность, мыши

A. O. Pryskoka

Acute intraperitoneal toxicity study of silver nanoparticles

Silver nanoparticles are prospective as an effective antimicrobial agent especially in treatment of antibiotic-resistant infections. Nevertheless, the toxicological aspect remains poorly studied. The aim of current work was to study acute toxicity of silver nanoparticles in terms of continuing their pre-clinical study. In previous studies these nanoparticles were proven to be non-genotoxic in vitro and in vivo, and non-mutagenic. In current studies we used 112 BALB/c mice (56 males and 56 females). Mice of each gender was divided into 7 study groups according to level of dose and 1 control group. For statistical evaluation of results there was used Finney's probit-analysis and specialized computer program. Mice were observed in first hours after administration and for 14 next days twice a day and clinical signs of acute intoxication were noticed. All mice (both died due to intoxication and sacrificed in the end of experiment) were subjects of autopsy and significant pathologic features were noticed. Weight measuring of animals was also provided. It was established that silver nanoparticles when administered intraperitoneally to BALB/c mice have LD₅₀ of 34,53 ± 3,87 mg/kg and 22,17 ± 2,36 mg/kg for males and females respectively (Finney probit-analysis method) and could be classified as III class or moderately toxic substance. Significant differences in LD₅₀ for males and females indicate the gender-specific toxicity of silver nanoparticles. Clinical signs of acute intoxication that were noticed during observation period include depression of movement activity in first hours after injection, hyperemia of ear blood vessels, disturbances in motion. Autopsy results showed pathologic changes in liver, hyperemia of internal organs blood vessels were noticed. All this signs evidence that silver nanoparticles have a prominent irritant effect when injected intraperitoneally and may cause inflammation. These facts should be taken into an account when designing parenteral drug form.

Key words: silver nanoparticles, acute toxicity, mice

Надійшла: 18.12.2013 р.

Контактна особа: Прискока Андрій Олегович, аспірант, кафедра фармакології та клінічної фармакології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 34, просп. Перемоги, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 67 247 73 58.