

ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ НАНОЧАСТИНОК СУЛЬФІДУ КАДМІЮ ТА СУЛЬФІДУ СВИНЦЮ, СТАБІЛІЗОВАНИХ ОРГАНІЧНИМИ СПОЛУКАМИ

Леоненко Н.С.¹, кандидат біол. наук, Леоненко О.Б.¹, доктор біол. наук,
Демецька О.В.¹, кандидат біол. наук, Ткаченко Т.Ю.¹, кандидат біол. наук,
Гродзюк Г.Я.², кандидат хім. наук

ДУ "Інститут медицини праці НАМН", м. Київ

¹ДУ "Інститут медицини праці НАМН України", м. Київ

²Інститут фізичної хімії ім. Л.В. Писаржевського НАН України, м. Київ

РЕЗЮМЕ. Мета. Дослідити цитотоксичність наночастинок сульфідів кадмію та свинцю різного розміру, отриманих колоїдним методом синтезу з використанням стабілізаторів різної будови.

Матеріали та методи. Досліджено водні суспензії наночастинок сульфідів свинцю і кадмію різних розмірів, отримані колоїдним методом і стабілізованих органічними сполуками (3-меркаптопропіонова кислота, поліетиленімін та желатин), а також водні еквімолярні розчини іонів свинцю та кадмію із стабілізаторами та еквімолярні розчини стабілізаторів. Дослідження цитотоксичності проводили на аналізаторі токсичності АТ-05 (Росія).

Результати. Розмірно-ефективної залежності цитотоксичності наночастинок сульфідів кадмію та сульфідів свинцю в різних стабілізаторах не виявлено. Найбільш токсичними були наночастинки сульфідів кадмію (15-20 нм) в поліетиленіміні. Наночастинки сульфідів свинцю в розмірі 10-15 нм не виявили цитотоксичної дії, натомість наночастинки сульфідів свинцю розміром 40-50 нм в 0,1% желатину спричиняли цитотоксичний ефект. Всі нативні розчини сульфідів свинцю (10, 20, 30 нм), стабілізовані 1% желатином, виявили цитотоксичну дію, а також при розведенні 1:1. Нативний розчин наночастинок сульфідів кадмію розміром 9 нм, стабілізованих 1% желатином спричиняв цитотоксичну дію, тоді як нативні розчини 17 та 30 нм виявилися не цитотоксичними.

Висновки. Цитотоксичність наноматеріалів може бути обумовлена як фізико-хімічними властивостями та розміром наночастинок, так і несучою фазою та стабілізаторами. Однією з детермінант цитотоксичності наночастинок можуть виступати просторові характеристики наночастинок і стабілізаторів. Втім не існує загальних закономірностей щодо їхнього впливу на токсичні властивості наночастинок, тому ці взаємозв'язки слід встановлювати окремо в кожному індивідуальному випадку.

Ключові слова: наночастинки сульфідів свинцю, наночастинки сульфідів кадмію, стабілізатори, цитотоксичність.

Вступ. Наноматеріали та наночастинки, які є продуктом сучасних нанотехнологій, мають комплекс унікальних властивостей, що відкривають широкі перспективи їх промислового застосування. Одночасно це створює ризик можливих несприятливих впливів наноматеріалів на організм людини, сільськогосподарських тварин і рослин, компоненти природних біоценозів. Отже, збільшення обсягів виробництва та використання нових матеріалів супроводжується інтенсивністю досліджень їхньої біологічної дії. В той же час, основні ефекти та механізми дії наночастинок, зокрема наночастинок металів, й досі залишаються остаточно не з'ясованими. Незважаючи на те, що вже накопичено значний експериментальний матеріал щодо токсичності деяких наноматеріалів для живих організмів, більшість досліджень з вивчення біологічних ефектів наночастинок і наноматеріалів виконано за допомогою різноманітних нестандартизованих методик та тест-систем, тому отримані результати у багатьох випадках є неспівставними [1].

Слід зазначити, що оцінка токсичної дії наноматеріалів є невід'ємною складовою ком-

плексної оцінки ризику. Відомо, що наночастинки та наноматеріали володіють комплексом фізичних, хімічних та біологічних властивостей, які часто радикально відрізняються від властивостей тих же речовин у формі суцільних середовищ або дисперсій частинок мікронного та більшого розміру. Високе співвідношення поверхні до об'єму і відповідно високий відсоток атомів на поверхні — головний фактор, що визначає відмінність у поведінці та властивостях нано- та мікрочастинок. Поверхневі атоми пов'язані з меншим числом сусідніх атомів і тому володіють надлишковою енергією, що робить їхні властивості (а значить, і властивості наночастинок в цілому) відмінними від властивостей атомів у товщі матерії. Через малий розмір наночастинок можуть не розпізнаватися захисними системами організму, не зазнавати біотрансформації та мати тривалий період напіввиведення з організму. Потрапляючи до організму, наночастинки здатні пошкоджувати біомембрани, порушувати функції біомолекул, зокрема молекул генетичного апарату клітини та клітинних органел, призводячи до порушення регуляторних процесів і загибелі клітини. При цьому відомо, що

потрапляння всередину клітин з подальшим розвитком несприятливих ефектів може залежати не тільки від розміру (наприклад, розмір є ключовим фактором у різних механізмах інтерналізації, — дифузіїю через мембранні канали (шириною 10-30 нм), ендоцитозом або енергозалежними механізмами за допомогою ряду різних маршрутів), а й шляху та тривалості впливу, а також змін у покритті їхньої поверхні. Так, особливості дисперсності та розчинності можуть впливати на цитотоксичність: модифікація поверхні солюбілізованих наночастинок може підвищувати токсичність та пошкоджувальну дію [2].

Саме, враховуючи таку особливість, слід відзначати принципову нестаціонарність та негомогенність інтерфейсу “нано-біо”, яка обумовлюється складною структурою білково-вуглеводно-ліпідного матриксу мембрани та мінливим (через клітинну секрецію й потоки тканинних рідин) складом середовища, що оточує наночастинку. Ці зміни можуть спричинити модифікацію властивостей поверхні наночастинок, а наночастинка, в свою чергу, може вплинути на хімічний склад середовища, частково розчиняючись в ньому або каталізуючи різні окисні процеси і генерацію активних форм кисню.

На токсичність та біологічну активність наноматеріалів також можуть впливати компоненти синтезу: розчинники (водні, неводні, неполярні), відновники неорганічні (гідразин, боргидрид натрію) або органічні (формальдегід, глюкоза, цитрати та ін.), стабілізатори природні (желатин, крохмаль, агар-агар та ін.) або синтетичні (полімери та поверхнево-активні речовини) [3].

Таким чином, ступінь небезпеки наноматеріалів залежить від великої кількості характеристик наночастинок та оточуючих факторів. У свою чергу, число потенційних комбінацій різних властивостей матеріалів може доходити до десятків тисяч, які нереально врахувати в експерименті на тваринах.

Тому, незважаючи на численні експериментальні дослідження, питання оцінки небезпеки наноматеріалів, зокрема наночастинок металів, залишається відкритим. Не зменшуючи ролі традиційних токсикологічних досліджень при оцінці ризику впливу наночастинок, дані, які отримані за допомогою використання так званих експрес-методів (дослідження цитотоксичності), надають попередню інформацію щодо токсичності наноматеріалів, з якими мають професійний контакт працівники. Головною перевагою більшості досліджень *in vitro* є можливість проводити тестування великого масиву об'єктів, а також можливість оцінки прямої токсичної дії на клітину (мішень), до

того ж отримані дані можна використовувати для аналізу механізму токсичної дії.

Отже, метою дослідження було дослідити цитотоксичність наночастинок сульфідів кадмію та свинцю різного розміру, отриманих колоїдним методом синтезу з використанням стабілізаторів різної будови.

Матеріали та методи досліджень.

Досліджено водні суспензії наночастинок сульфідів свинцю і кадмію різних розмірів, стабілізованих органічними сполуками, а також водні еквімолярні розчини іонів свинцю та кадмію із стабілізаторами та еквімолярні розчини стабілізаторів, одержані колоїдним методом у відділі фотохімії Інституту фізичної хімії ім. Л.В.Писаржевського НАН України.

Перша серія досліджень

CdS №1. Наночастинок сульфідів кадмію, стабілізовані 3-меркаптопропіоновою кислотою (МПК). $[CdS] = 1 \times 10^{-2}$ моль/л (1,44 г/л), $[МПК] = 1 \times 10^{-2}$ моль/л (1,05 г/л), лужне середовище $[NaOH] = 1 \times 10^{-2} M$ (0,4 г/л). В якості розчинника – вода. Холоста: 3-меркаптопропіонова кислота + іони Cd^{2+} , де $[МПК] = 1 \times 10^{-2}$ моль/л (1,05 г/л), $[Cd^{2+}] = 1 \times 10^{-2}$ моль/л (1,12 г/л). Розмір: 4-6 нм.

CdS №2. Наночастинок сульфідів кадмію, стабілізовані поліфосфатом натрію (ПФNa). $[CdS] = 5 \times 10^{-3}$ моль/л (720 мг/л), $[ПФNa] = 5 \times 10^{-3}$ моль/л (545 мг/л). В якості розчинника – вода. Холоста: поліфосфат натрію + іони Cd^{2+} , де $[ПФNa] = 5 \times 10^{-3}$ моль/л (545 мг/л) $[Cd^{2+}] = 5 \times 10^{-3}$ моль/л (560 мг/л). Розмір: 15-20 нм.

CdS №3. Наночастинок сульфідів кадмію, стабілізовані поліетиленіміном. $[CdS] = 1 \times 10^{-2}$ моль/л (1,44 г/л), $[ПЕІ] = 0.25$ мас.%. В якості розчинника – вода. Холоста: поліетиленімін + іони Cd^{2+} , де $[ПЕІ] = 0.25$ мас.%, $[Cd^{2+}] = 1 \times 10^{-2}$ моль/л (1,12 г/л). Володіють інтенсивною ФЛ (Квантовий вихід ФЛ до 10%). Розмір: 1.8-2 нм.

PbS №1. Наночастинок сульфідів свинцю, стабілізовані желатином. $[PbS] = 1 \times 10^{-3}$ моль/л (239 мг/л), $[желатин] = 1$ мас.%. В якості розчинника – вода. Холоста: желатин + іони Pb^{2+} , де $[желатин] = 1$ мас.%, $[Pb^{2+}] = 1 \times 10^{-3}$ моль/л (207 мг/л). Розмір 10-15 нм.

PbS №2. Наночастинок сульфідів свинцю, стабілізовані желатином. $[PbS] = 1 \times 10^{-3}$ моль/л (239 мг/л), $[желатин] = 0.01$ мас.%. В якості розчинника – вода. Холоста: желатин + іони Pb^{2+} , де $[желатин] = 0.01$ мас.%, $[Pb^{2+}] = 1 \times 10^{-3}$ моль/л (207 мг/л). Розмір 40-50 нм.

Друга серія досліджень

Наночастинок сульфідів кадмію розміром 9 нм, 17 нм, 30 нм, стабілізовані желатином (1мас.%), та наночастинок сульфідів свинцю

розміром 10 нм, 20 нм, 80 нм, стабілізовані желатином (1мас.%).

Дослідження цитотоксичності проводили на аналізаторі токсичності АТ-05 (Росія). Для оцінки цитотоксичності наноматеріалів в якості тест-об'єкту було використано сперму великої рогатої худоби, заморожену в парах рідкого азоту. В основі методу лежить дослідження зміни залежності рухливої активності сперматозоїдів від часу при впливі хімічних сполук.

Оцінку ступеня цитотоксичності розраховували за величиною індексу токсичності It, що дорівнює відношенню параметру рухливості суспензії сперматозоїдів у дослідному зразку до параметру рухливості сперматозоїдів у контрольному зразку та вираженої в процентах. При значенні індексу токсичності від 1 до 70% та більше 120% дослідний розчин вважається цитотоксичним.

Результати та їх обговорення. На першому етапі досліджень було оцінено цитотоксичність еквімолярних розчинів органічних стабілізаторів (табл.1.) та водних суспензій наночастинок сульфідів свинцю і кадмію, а також водних еквімолярних розчинів іонів свинцю та кадмію (табл. 2).

Було встановлено, що меркаптопропіонова кислота (МПК), поліфосфат натрію (ПФNa) та желатин 1% не виявили цитотоксичної дії, тоді як поліетиленімін (ПЕІ), поліетиленімін 0, 25%, поліетиленімін у розведенні 1:10 та желатин 0,1% були токсичними. Останнє може бути викликане змінами в просторовому упорядкуванні макромолекул желатину у розчині, що може призводити до зміни фізичних властивостей і як наслідок, впливати на біологічну активність [4].

Розмірно-ефективної залежності цитотоксичності наночастинок сульфідів кадмію (1,8-2 нм, 4-6 нм, 15-20 нм) у різних стабілізаторах не виявлено. Нативні розчини наночастинок сульфідів кадмію розміром 4-6 нм, стабілізовані МПК, та розміром 15-20 нм, стабілізовані ПФNa, спричиняли цитотоксичну дію. Найбільш токсичними були наночастинки сульфідів кадмію (15-20 нм) в ПЕІ, оскільки цитотоксичний ефект спостерігався навіть при їхньому розведенні.

Також проведеними дослідженнями встановлено, що наночастинок сульфідів свинцю розміром 10-15 нм не виявили цитотоксичної дії, натомість наночастинок сульфідів свинцю розміром 40-50 нм в 0,1% желатину спричиняли цитотоксичний ефект. Таким чином, одержані дані свідчать про складну залежність співвідношення наноматеріалів і біологічних об'єктів, що може бути пов'язане як з величи-

Таблиця 1

Дослідження цитотоксичності еквімолярних розчинів органічних стабілізаторів

№	Розчин	Індекс, токсичності, %
1	ПЕІ	17,2
2	ПЕІ 1:10	13,8
3	ПЕІ 0,25%	1,0
4	ПЕІ 0,25% 1:100	115,6
5	Желатин 0,1%	150,0
6	Желатин 1%	107,4
7	ПФNa $5 \times 10^{(-3)}$ м 1:100	103,4
8	ПФNa $5 \times 10^{(-3)}$ м	101,5
9	МПК $1 \times 10^{(-2)}$ м	109,1
10	МПК $1 \times 10^{(-2)}$ м	105,9

Таблиця 2

Дослідження цитотоксичності водних суспензій наночастинок сульфідів свинцю і кадмію та водних еквімолярних розчинів іонів свинцю та кадмію

№	Зразок	Розмір, нм	Індекс токсичності, %
1	CdS №1 МПК	4-6	12,6
2	CdS №1 холоста	4-6	24,4
3	CdS №1 МПК 1:100	4-6	94,6
4	CdS №1 холоста 1:100	4-6	79,2
5	CdS ПФNa №2	15-20	1,0
6	CdS №2 холоста	15-20	39,5
7	CdS ПФNa №2 1:100	15-20	77,9
8	CdS №2 холоста 1:100	15-20	74,7
9	CdS ПЕІ №3	1,8-2	46,0
10	CdS №3 холоста	1,8-2	10,2
11	CdS ПЕІ №3 1:100	1,8-2	50,6
12	CdS №3 холоста 1:100	1,8-2	52,6
15	PbS №1	10-15	91,1
16	PbS №1 холоста	10-15	101,5
17	PbS №1 1:100	10-15	112,8
18	PbS №1 холоста 1:100	10-15	111,4
19	PbS №2	40-50	1,0
20	PbS №2 холоста	40-50	5,1

Дослідження цитотоксичності водних суспензій наночастинок сульфідів свинцю і кадмію, стабілізованих желатином (1%)

№	Зразок	Індекс токсичності, %				
		нативний	1:1	1:10	1:100	1:1000
1	PbS 10 нм	32,1	67,2	88,5	128,7	117,2
2	PbS 20 нм	1,0	27,2	6,6	95,0	106,4
3	PbS 80 нм	9,3	50,4	87,9	110,0	118,6
4	CdS 9 нм	61,7	120,0	104,6	100,0	109,2
5	CdS 17 нм	73,5	162,4	118,4	115,1	104,6
6	CdS 30 нм	77,9	120,4	116,4	102,0	105,6

ною та хімічною природою наночастинок, так і з несучою фазою та стабілізаторами.

Також було проведено дослідження наночастинок сульфиду кадмію та сульфиду свинцю різних розмірів, стабілізованих 1% желатином (друга серія досліджень) (табл. 3).

Всі нативні розчини сульфиду свинцю (10, 20, 30 нм), стабілізовані 1% желатином, виявили цитотоксичну дію, а також при розведенні 1:1.

Не спричинили цитотоксичного ефекту розчини сульфиду свинцю розміром 10 нм у розведенні 1:10 та 1:1000, розміром 20 нм у розведенні 1:100 та 1:1 000, розміром 80 нм 1:10, 1:100, 1:1000.

У свою чергу, серед нативних розчинів наночастинок сульфиду кадмію 17 нм та 30 нм не спричинили цитотоксичної дії, натомість 9 нм виявилися цитотоксичними. При розведенні 1:1 розчин наночастинок сульфиду свинцю розміром 17 нм спричиняв цитотоксичну дію. В розведеннях 1:10, 1:100, 1:1000 всі досліджувані розчини наночастинок сульфиду кадмію не виявили цитотоксичної дії.

Одержані результати свідчать на користь проведення подальших експериментальних

досліджень цитотоксичності наночастинок одного розміру в різних стабілізаторах та наночастинок різних розмірів у певному стабілізаторі. Загалом, для розуміння механізмів дії та реактивності наночастинок необхідно використання батареї стандартизованих токсикологічних досліджень та врахування таких фізико-хімічних характеристик як розмір, морфологія, площа поверхні, поверхневий заряд, модифікація поверхні, хімічний склад, кристалічна структура та агломерація [1, 5].

Висновки. 1. Цитотоксичність наноматеріалів може бути обумовлена як фізико-хімічними властивостями та розміром наночастинок, так і несучою фазою та стабілізаторами.

2. Однією з детермінант цитотоксичності наночастинок, що слід враховувати при виробництві наноматеріалів та оцінці ризику, можуть виступати просторові характеристики як наночастинок, так і стабілізаторів. При цьому не існує загальних закономірностей щодо їхнього впливу на токсичні властивості наночастинок, тому ці взаємозв'язки слід встановлювати окремо в кожному індивідуальному випадку.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Klien K.* Genotoxicity of metal nanoparticles: focus on in vivo studies / K. Klien, J. Godnić-Cvar // *Arh Hig Rada Toksikol.* – 2012. – V.63, N2. – P.133–145.
2. *Kwon J.Y.* Current investigations into the genotoxicity of zinc oxide and silica nanoparticles in mammalian models in vitro and in vivo: carcinogenic/genotoxic potential, relevant mechanisms and biomarkers, artifacts, and limitations / J.Y. Kwon, P. Koedrith, Y.R. Seo // *Int J Nanomedicine.* – 2014. – V.9, Suppl 2. – P.271–286.
3. *Неупокоева А.В.* Синтез супрамолекулярных наноматериалов для регистрации голограмм и оптической обработки информации / А.В. Неупокоева, А.Н. Малов // *Компьютерная оптика.* – 2008. – Т.32, №4. – С.348–352.
4. *Synthesis and characterization of white-emitting CdS quantum dots stabilized with polyethylenimine* / Rayevska O.E., Grodzyuk G.Ya., Dzhagan V.M. [et al.] // *J. Phys. Chem. C.* – 2010. – V.114, N51. – P.22478–22486.
5. *Effect of contact angle, zeta potential and particles size on the in vitro studies of Al₂O₃ and SiO₂ nanoparticles* / [G. Karunakaran, R. Suriyaprabha, V. Rajendran, N. Kannan] // *IET Nanobiotechnol.* – 2015. – V.9, N1. – P.27–34.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА КАДМИЯ И СУЛЬФИДА СВИНЦА,
СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

Н.С. Леоненко, О.Б. Леоненко, А.В. Демецкая, Т.Ю. Ткаченко, Г.Я. Гродзюк

РЕЗЮМЕ. Цель. Исследовать цитотоксичность наночастиц сульфида кадмия и свинца различных размеров, полученных коллоидным методом синтеза с применением стабилизаторов различного строения.

Материалы и методы. Изучали водные суспензии наночастиц сульфидов кадмия и свинца различных размеров, полученных методом химического синтеза и стабилизированных органическими соединениями (3-меркаптопропионовой кислотой, полиэтиленимином, желатином), а также водные эквимоларные растворы ионов кадмия и свинца со стабилизаторами и эквимоларные растворы стабилизаторов. Исследование цитотоксичности проводили на анализаторе токсичности АТ-05 (Россия).

Результаты. Размерно-эффективной зависимости цитотоксичности наночастиц сульфида кадмия и сульфида свинца в различных стабилизаторах не обнаружено. Наиболее токсичными были наночастицы сульфида кадмия (15-20 нм) в полиэтиленимине. Наночастицы сульфида свинца в размере 10-15 нм не проявили цитотоксического действия, тогда как наночастицы сульфида свинца размером 40-50 нм в 0,1% желатине вызывали цитотоксический эффект. Все нативные растворы сульфида свинца (10, 20, 30 нм), стабилизированные 1% желатином, обнаружили цитотоксическое действие, а также при разведении 1:1. Нативный раствор наночастиц сульфида кадмия размером 9 нм, стабилизированных 1% желатином вызывал цитотоксическое действие, тогда как нативные растворы 17 и 30 нм оказались нецитотоксическими.

Выводы. Цитотоксичность наноматериалов может быть обусловлена как физико-химическими свойствами и размером наночастиц, так и несущей фазой и стабилизаторами. Одной из детерминант цитотоксичности наночастиц, что следует учитывать при производстве наноматериалов и оценке риска, могут выступать пространственные характеристики как наночастиц, так и стабилизаторов. При этом не существует общих закономерностей относительно их влияния на токсические свойства наночастиц, поэтому эти взаимосвязи следует устанавливать отдельно в каждом индивидуальном случае.

Ключевые слова: наночастицы сульфида свинца, наночастицы сульфида кадмия, стабилизаторы, цитотоксичность.

STUDY OF THE CYTOTOXICITY OF CDS AND PBS NANOPARTICLES, STABILIZED WITH ORGANIC COMPOUNDS

N. Leonenko, O. Leonenko, O. Demetska, T. Tkachenko, G. Grodzyuk

SUMMARY. Objective. To investigate cytotoxicity of CdS and PbS nanoparticles of various size, synthesized by colloid method using different stabilizers.

Materials and Methods. Water suspensions of CdS and PbS nanoparticles of various size, synthesized by colloid method and stabilized with organic compounds (mercaptopyropionic acid, polyethyleneimine, gelatins), water equimolar solutions of Cd and Pb ions with stabilizers as well as equimolar solutions of stabilizers were analyzed. Cytotoxicity was studied using toxicity analyzer AT-05 (Russia).

Results. Size-effective dependence of CdS and PbS nanoparticles cytotoxicity was not found. CdS nanoparticles (15-20 nm) in polyethyleneimine showed the highest toxicity. PbS nanoparticles (10-15 nm) were not presented cytotoxic effect in contrast to PbS nanoparticles (40-50 nm) in 0,1% gelatins. All native solutions of PbS (10, 20, 30 nm), stabilized with 1% gelatins, as well as diluted 1:1, displayed cytotoxic effect. Native solution of CdS nanoparticles (9 nm), stabilized with 1% gelatins, were shown to be cytotoxic, whereas native solutions 17 and 30 nm were not.

Conclusions. Cytotoxicity of nanomaterials may be caused by physico-chemical properties and nanoparticles size as well as carrier phase and stabilizers. Spatial characteristics of nanoparticles and stabilizers also may be nanoparticles cytotoxic determinants. At that there are no general rules of their impact on toxic properties of nanoparticles, so this impact has to be determined in each individual case.

Key words: PbS nanoparticles, CdS nanoparticles, stabilizers, cytotoxicity.

Надійшла до редакції 11.03.2015 р.