

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРОРАЛЬНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА АКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ У КРЫС

Власов Р.В.², Каде А.Х.¹, Барышев М.Г.², Трофименко А.И.¹, Шашков Д.И.², Туровая А.Ю.¹, Романовский К.А.², Башинский А.Е.¹, Гончарова Е.Н.¹, Уварова Е.А.¹, Пишкина А.Ю.¹, Черкесова Д.Р.¹

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, e-mail: artentrofimenko@mail.ru;

²ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет, Краснодар, e-mail: cybargentum@mail.ru

Исследуемые наночастицы серебра получены с помощью метода кавитационно-диффузионного фотохимического восстановления ионов серебра. По данным электронной микроскопии они имеют сферическую форму и средний размер $12,5 \pm 2,5$ нм. Результаты масс-спектрометрии свидетельствуют, что 30-дневное употребление раствора наносеребра 5 мг/л приводит к росту его содержания в почках (в 94 раза), в головном мозге (58 раз), в тонком кишечнике (32,5 раз), в селезенке (21,8 раз), в печени (15,6 раз) и в сердце (4,4 раза) крыс. ЭПР-спектроскопия показывает, на фоне значительного накопления серебра в организме крыс, содержание свободных радикалов в головном мозге (на 22,6%), печени (на 29,5 %) и сердце (на 88,1%) снижается, в тонком кишечнике достоверных различий в содержании радикалов не выявлено, а в селезенке (на 92,3%) и почках (на 51,3%) оно возрастает. Таким образом, употребление крысами раствора с концентрацией наносеребра 5 мг/литр и средним размером частиц $12,5 \pm 2,5$ нм при свободном спавании в течение 30 дней приводит к значительному накоплению серебра во внутренних органах и разнонаправленным изменениям оксидативного статуса.

Ключевые слова: серебро, наночастицы, ЭПР-спектроскопия, масс-спектрометрия, свободно-радикальное окисление, крыса.

INFLUENCE OF CHRONIC PERORAL ADMINISTRATION OF SILVER NANOPARTICLES ON THE ACTIVE PROCESSES OF FREE RADICAL OXIDATION IN AN EXPERIMENT ON RATS

Vlasov R.V.², Kade A.H.¹, Baryshev M.G.², Trofimenko A.I.¹, Shashkov D.I.², Turovaja A.Ju.¹, Romanovskij K.A.², Bashinskij A.E.¹, Goncharova E.N.¹, Uvarova E.A.¹, Pishkina A.Ju.¹, Cherkesova D.R.¹

¹FSBEI HE «Kuban State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnodar, e-mail: artentrofimenko@mail.ru;

²FSBEI HE «Kuban State University», Krasnodar, e-mail: cybargentum@mail.ru

Studied silver nanoparticles were obtained by the method of diffusion-cavitation photochemical reduction of silver ions. By electron microscopy data they have a spherical shape and an average size of 12.5 ± 2.5 nm. The results of mass spectrometry point that the 30-days usage of nanosilver solution of 5 mg / liter leads to an increase of its content in kidneys (94 times), brain (58 times), small intestine (32.5 times), spleen (21.8 times), liver (15.6 times) and heart (4.4 times) in rats. By a significant accumulation of silver in rats EPR spectroscopy shows the decrease of the content of free radicals in brain (22.6 %), liver (29.5 %) and heart (88.1 %), the increase of it in spleen (92.3 %) and kidney (51.3 %), but in small intestine significant differences in the content of radicals haven't been identified. So the usage of nanosilver solution with a concentration of 5 mg / liter and a mean particle size of 12.5 ± 2.5 nm by rats at the free soldering for 30 days leads to a significant accumulation of silver in internal organs and oxidative multidirectional changes.

Keywords: silver, nanoparticles, EPR spectroscopy, mass spectrometry, free radical oxidation, rat.

Ввиду повсеместного применения наносеребро может рассматриваться как потенциальный загрязнитель окружающей среды [17, 31, 33]. Токсикологические свойства наносеребра весьма неоднозначны и значительно отличаются от таковых, в сравнении с солями серебра [20, 21, 25, 32]. Традиционно авторы изучают влияние на живые организмы

высоких доз наносеребра, в основном при парентеральном или ингаляционном пути их введении [5, 20, 24, 25]. При этом недостаточно исследованы биоэффекты серебра при хроническом пероральном поступлении его в низких дозах, между тем именно такая ситуация становится наиболее вероятной при загрязнении им окружающей среды [5, 33].

Цель работы – изучить влияние хронического перорального употребления раствора наночастиц серебра с концентрацией 5 мг/л на выраженность процессов свободно-радикального окисления в организме крыс.

Материалы и методы исследования

Исследования на животных выполнены в лаборатории кафедры общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ, а дальнейшее изучение полученного биоматериала проводилось на базе ФГБОУ ВО КубГУ. Эксперименты проведены на 24 белых нелинейных крысах-самцах средней массой $98 \pm 1,5$ грамм. Эксперимент на животных продолжался с 20 октября по 18 ноября 2015 года. Крысы содержались в условиях 12 часового светового дня, постоянной комнатной температуры 25°C , свободного доступа к воде и корму. Содержание животных и постановка экспериментов проводились в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Наноразмерное серебро синтезировано методом кавитационно-диффузионного фотохимического восстановления на базе ФГБОУ ВПО КубГУ [1, 2]. Исследуемый раствор наносеребра ежедневно получали путем разведения препарата в питьевой воде до рабочей концентрации 5 мг/л.

Характеристика групп животных: группа № 1 (n=12) – контрольная, крысы получали в течение 30 суток питьевую воду; группа № 2 (n=12) – опытная, крысы получали на протяжении 30 дней питьевую воду с концентрацией наночастиц серебра 5 мг/л. Разбивка крыс на группы проводилась случайным образом.

В ходе эксперимента ежедневно рассчитывалось количество серебра, поступившего в организм крысы за сутки из расчета на 1 килограмм массы тела (Дсут – суточная доза), с последующим определением его суммарного потребления за 30 дней из расчета на 1 килограмм массы тела (Дк – курсовая доза). Взвешивание крыс в ходе эксперимента проводилось ежедневно.

Спустя 30 дней (завершение эксперимента), крысы обеих групп подвергались эвтаназия путем декапитации, предварительно животные вводились в золотил-ксилазиновый наркоз [7]. У трупа проводился забор головного мозга, печени, почек, сердца, селезенки и тонкого кишечника.

Для визуализации и описания наночастиц серебра использован растровый электронный микроскоп JEOLJSM-7500F.

Содержание серебра во внутренних органах определяли методом масс-спектрометрии с использованием квадрупольного масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой ThermoScientific – Xseries II (США), пробоподготовка проводилась по Rooney [29].

Оценку содержания свободных радикалов в органах проводили путем измерения спектров ЭПР на спектрометре JES FA300 (JEOL, Япония) в X-диапазоне. Условия измерения: СВЧ мощность 1 мВт, частота микроволнового излучения 9144 МГц, амплитуда высокочастотной модуляции 0,1 мТл. Образцы измеряли в кварцевой ампуле (5 мм), масса навески в зоне резонатора составляла 0,03 г.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения «Statistica 10 version» фирмы «StatSoftInc.». Данные взвешивания крыс и измерения размеров наночастиц серебра выражали путем расчета среднего (M) и стандартного отклонения (SD), в виде $M \pm SD$. Полученные результаты исследуемых групп после статистической обработки выражали в виде медианы (Me) с использованием 25 и 75 перцентилей (p_{25} и p_{75}). Для проверки гипотезы о гауссовом распределении показателей в исследуемых группах использовали критерий Шапиро – Уилка. В связи с тем, что распределение значений исследуемых показателей в группах отличалось от нормального, их сравнение проводилось по непараметрическому критерию Манна – Уитни (U_{test}), с установлением уровня значимости $*p \leq 0,01$.

Результаты и их обсуждение

В течение всего периода работы случаев выведения животных из исследования не было. При осмотре внешний вид и поведение крыс в группах № 1 и № 2 видимых отличий не имели. На момент окончания эксперимента средняя масса крыс в группе № 1 составила 148 ± 8 грамм, а в группе № 2 – 150 ± 6 грамм, при этом статистически значимых отличий между группами не выявлено ($p \geq 0,01$).

По данным электронной микроскопии наночастицы серебра имели сферическую форму и средний размер $12,5 \pm 2,5$ нм. В нашей работе мы сосредоточились на исследовании биологических свойств низких концентраций наносеребра при его хроническом пероральном поступлении в организм крыс, в условиях именно свободного спаивания его раствора (ситуация, по нашему мнению, наиболее приближенная к реальной). Дк за период исследования (30 дней) составила $8,2 \pm 0,96$ мг/кг, что на порядок ниже в сравнении с работами аналогичного профиля [3-5, 8, 16, 23, 32].

Данные масс-спектрометрии показывают, 30-дневное употребление питьевой воды с концентрацией наночастиц серебра 5 мг/л приводит к статистически значимому

($p=0,0001 \leq 0,01$), в сравнении с контролем, увеличению содержания серебра во внутренних органах крыс из группы № 2. Содержание серебра возрастает в почках в 94 раза, головном мозге в 58 раз, тонком кишечнике в 32,5 раз, селезенке – 21,8 раз, печени – 15,6 раз, сердце в 4,4 раза крыс, что отражает выраженные кумулятивные свойства наночастиц серебра (табл. 1).

Таблица 1

Содержание серебра во внутренних органах крыс из групп № 1 и № 2

Ткань мкг/г		Почки	Головной мозг	Тонкий кишечник	Селезенка	Печень	Сердце
Группа №1	Me	0,010	0,004	0,006	0,005	0,006	0,014
	p75	0,011	0,006	0,002	0,004	0,007	0,019
	p25	0,005	0,003	0,008	0,007	0,005	0,012
U test	$p \leq 0,01$	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Группа №2	Me	0,940	0,232	0,195	0,109	0,094	0,062
	p75	0,931	0,250	0,189	0,098	0,098	0,069
	p25	0,948	0,210	0,199	0,122	0,084	0,061

ЭПР-спектроскопия показывает, содержание свободных радикалов в головном мозге (на 22,6 %), печени (на 29,5 %) и сердце (на 88,1 %) снижается ($p=0,0001 \leq 0,01$), в тонком кишечнике достоверно не меняется ($p=0,0140 \geq 0,01$), а в селезенке (на 92,3 %) и почках (на 51,3 %) значительно возрастает ($p=0,0001 \leq 0,01$) (табл.2).

К моменту окончания эксперимента содержание серебра в ткани мозга возрастает в 58 раз, но в то же время, по данным ЭПР-спектроскопии, содержание свободных радикалов в нем снижается практически на 22,6 %. Основываясь на полученных данных, можно сделать предположение о наличии антиоксидантных свойствах наносеребра. О значительных кумулятивных свойствах наноразмерного серебра в отношении ткани головного мозга было известно и ранее [11]. Однако в большинстве известных литературных источников описывается выраженный прооксидантный эффект наноразмерного серебра. Индукции реакций свободно-радикального окисления, а также активации апоптоза отводится ключевая роль в его нейротоксическом влиянии [6, 17].

Анализируя данные литературы, мы видим, что выводы о нейротоксичности серебра основываются преимущественно на результатах культуральных исследований [19, 32]. В частности показана дозозависимая способность наносеребра, вызывать нарушения в работе ферментов цепи переноса электронов [14]. В то же время известно, что митохондриальную дисфункцию вызывают лишь частицы серебра размером 75 нм, а более мелкие размером 10 нм напротив, запускают нейрональные стресс-протективные пути [13]. Показана способность

наносеребра с размером частиц 70 нм к выраженной кумуляции в организме, а также их дозозависимые негативные эффекты на культурах клеток крыс и человека, выявлена значительная модификация негативных свойств серебра при взаимодействии с белками при *in vivo* применении [9].

Таблица 2

Концентрация парамагнитных центров во внутренних органах исследуемых крыс

Ткань		Печень	Головной мозг	Тонкий кишечник	Селезенка	Сердце	Почки
Группа №1	Me	10849	2654	2278	975	833	264
	p75	10911	2783	2295	1014	902	289
	p25	10544	2578	2199	922	789	247
U test	p≤0,01	0,0001	0,0001	0,0140*	0,0001	0,0001	0,0001
Группа №2	Me	7648	2053	2006	12734	99	539
	p75	7699	2156	2186	13842	109	622
	p25	7523	2038	1927	12114	94	515

Несмотря на то, что серебро из организма в основном выводится с калом, наибольшее его накопление отмечено для почек (рост в 94 раза), при этом содержание свободных радикалов в них также возросло на 51,3 %. Много серебра накапливалось в селезенке (рост в 21,8 раз), при этом содержание свободных радикалов в ней возросло на 92,3 %. Полученные результаты хорошо согласуются с описанными в литературных источниках [20, 28].

В настоящее время не существует единого мнения по вопросу влияния наносеребра на печень. Многие авторы показывают его токсичность, которая проявляется в виде активации процессов свободно-радикального окисления, некроза и апоптоза гепатоцитов, воспалительных изменений в паренхиме печени, а также увеличения содержания маркеров цитолиза в крови [10, 15-18, 23, 28]. Однако существуют исследования, отрицающие токсическое действие даже высоких доз наносеребра [20, 22, 27].

В нашей же работе содержание серебра в печени возрастает в 15,6 раз, что значительно уступает его содержанию в почках, головном мозге, тонком кишечнике и селезенке (табл.1), эту особенность можно объяснить высокой активностью процессов выведения серебра из печени [11, 20]. Содержание свободных радикалов в печени на этом фоне падает на 29,5 % (табл.2). Так как основным поставщиком радикалов в печени является микросомальная система окисления, то можно было бы предположить факт снижения их содержания ее угнетением, однако существуют исследования, отрицающие данную возможность [26]. В то же время имеются работы, показывающие, что наносеребро не только

запускает реакции свободно-радикального окисления, но и выступает в качестве стимулятора экспрессии антиоксидантных ферментов [12].

В литературе известно явление выраженного нарушения функции эпителия тонкого кишечника у крыс при употреблении растворов наносеребра вследствие разрушения микроворсинок [30]. В нашей работе, несмотря на увеличение содержания серебра в кишечнике в 32,5 раз, мы наблюдали некоторое снижение содержания свободных радикалов, которое, однако, статистически достоверным не являлось.

К окончанию исследования содержание серебра в сердце крыс возрастало в 4,4 раза, а количество свободных радикалов, напротив, снижалось на 88,1 %, что показывает выраженные антиоксидантные свойства исследуемого раствора наносеребра, что в целом не соответствует данным литературы [16].

В зависимости от свойств наночастиц серебра, их дозировки, пути и способа применения меняется их проникающая и кумулятивная способность, а также динамика продукции ими ионов серебра, ответственных за его токсические эффекты. Этим объясняется наличие полярных воззрений на сущность биоэффектов, возникающих в организме животных и человека при хроническом пероральном употреблении растворов наносеребра [17, 22, 27, 28].

Заключение

30-дневное употребление крысами питьевой воды с концентрацией наносеребра 5 мг/л приводит к увеличению его содержания в почках в 94 раза, головном мозге в 58 раз, тонком кишечнике в 32,5 раз, селезенке 21,8 раз, печени 15,6 раз и сердце в 4,4 раз. По данным ЭПР-спектроскопии, мы видим, что содержание свободных радикалов в головном мозге на 22,6 %, печени на 29,5 % и сердце на 88,1 % ниже, в тонком кишечнике достоверных изменений не выявлено, а в селезенке на 92,3% и почках на 51,3% оно возрастает.

Таким образом, употребление крысами раствора с концентрацией наносеребра 5 мг/литр и средним размером частиц $12,5 \pm 2,5$ нм в течение 30 дней характеризуется значительным его накоплением во внутренних органах и разнонаправленными по выраженности изменениями активности процессов свободно-радикального окисления.

Список литературы

1. Власов Р.В. Оптимизация физико-химических условий, используемых для получения наночастиц серебра // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 2-7. – С. 1397-1400.
2. Басов А.А. Устройство для получения наночастиц серебра патент на полезную модель // Патент России №150504. – 16.06.2014.

3. Гмошинский И.В. Токсикологическая оценка наноразмерного коллоидного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном. III. Энзимологические, биохимические маркеры, состояние системы антиоксидантной защиты // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – № 2. – С. 14-23.
4. Зайцева Н.В. Токсикологическая оценка наноразмерного коллоидного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном, в 92-дневном эксперименте на крысах. II. Морфология внутренних органов // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – № 1. – С. 47-55.
5. Петрицкая Е.Н. К вопросу о токсичности наночастиц серебра при пероральном введении коллоидного раствора // Альманах клинической медицины. – 2011. – № 25. – С. 9-12.
6. Соседова Л.М. Оценка биологических эффектов воздействия наносеребра на ткань головного мозга экспериментальных животных // Медицина труда и промышленная экология. – 2015. – № 4. – С. 26-30.
7. Трофименко А.И. β -эндорфин и цитокиновый профиль в динамике экспериментального ишемического инсульта // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6; URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=16368> (дата обращения: 26.12.2016).
8. Шумакова А.А. Токсикологическая оценка наноразмерного коллоидного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном. I. Характеристика наноматериала, интегральные, гематологические показатели, уровень тиоловых соединений и апоптоз клеток печени // Вопросы питания. – 2015. – Т. 84. – № 6. – С. 46-51.
9. Ahlberg S. PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments // Beilstein J. Nanotechnol. – 2014. – V. 5. – P. 1944-1965.
10. Al Gurabi M.A. In vivo DNA damaging and apoptotic potential of silver nanoparticles in Swiss albino mice // Onco Targets and Therapy. – 2015. – V. 8. – P. 295-302.
11. Antsiferova A. Extremely low level of Ag nanoparticle excretion from mice brain in in vivo experiments // Materials Science and Engineering. – 2015. – V. 98. – P.1-6.
12. Arora S. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells // Toxicol Appl. Pharmacol. – 2009. – V. 236. – P. 310-318.
13. Chorley B. The cellular and genomic response of rat dopaminergic neurons (N27) to coated nanosilver // Neuro Toxicology. – 2014. – V. 45. – P. 12-21.
14. Costa C.S. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain // Mol. Cel. Biochem. – 2010. – V. 342. – P. 51-56.

15. El Mahdy M.M. Evaluation of hepatotoxic and genotoxic potential of silver nanoparticles in albino rats // *Experimental and toxicologic pathology*. – 2015. – V. 67(1). – P. 21-29.
16. Elle Ebabe R. Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats: Effects on oxidative stress and inflammation // *Food Chem. Toxicol.* – 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.071>.
17. Gaillet S., Rouanet M.J. Silver nanoparticles: their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – a review // *Food and Chemical Toxicology*. – 2015. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fct.2014.12.019>.
18. Gaiser B.K. Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes in vitro // *Toxicological sciences*. – 2013. – V. 131(2). – P. 537-547.
19. Haase A. Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: uptake, oxidative stress and acute calcium responses // *Toxicological sciences*. – 2012. – V. 126(2). – P. 457-468.
20. Hendrickson O.D. Toxicity of nanosilver in intragastric studies: biodistribution and metabolic effects // *Toxicology Letters*. – 2016. – V. 241. – P. 184-192.
21. Jemec A. An interlaboratory comparison of nanosilver characterisation and hazard identification: harmonising techniques for high quality data // *Environment International*. – 2016. – V. 87. – P. 20-32.
22. Jiao Z.H. Hormesis effects of silver nanoparticles at non-cytotoxic doses to human hepatoma cells // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9(7): e102564. DOI: 10.1371/journal.pone.0102564.
23. Kim Y.S. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2010. – V. 7. – P. 7-20.
24. Lee T.Y. Bioenergetic failure correlates with autophagy and apoptosis in rat liver following silver nanoparticle intraperitoneal administration // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2013. – V. 10. P. 10-40.
25. Mc Shan D., Ray C.P., Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver // *J. Food Drug Anal.* – 2014. – V. 22(1). – P. 116-127.
26. Munger A.M. Assessing orally bioavailable commercial silver nanoparticle product on human cytochrome P450 enzyme activity // *Nanotoxicology, Early Online*: 1–8. DOI: 10.3109/17435390.2014.948092.
27. Munger A.M. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2013. DOI:10.1016/j.nano.2013.06.010.

28. Patlolla A.K., Hackett D., Tchounwou B.P. Silver nanoparticle induced oxidative stress-dependent toxicity in Sprague-Dawley rats // *Mol. Cell Biochem.* – 2015. – V. 399(0). – P. 257–268.
29. Rooney R. Determination of silver in animal tissues by a wet-oxidation process followed by atomic-absorption spectrophotometry // *Analyst.* – 1975. – V. 100. – P. 471-475.
30. Shahare B., Yashpal M., Singh G. Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice // *Toxicol. Mech. Methods.* – 2013. – V. 23. – P. 161–167.
31. Sharma K.V. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: fate, stability and toxicity // *Advances in Colloid and Interface Science.* – 2014. – V. 204. – P. 15-34.
32. Sun C. Silver nanoparticles induced neurotoxicity through oxidative stress in rat cerebral astrocytes is distinct from the effects of silver ions // *Neurotoxicology.* – 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.09.007>.
33. Wang Z., Xia T., Liu S. Mechanisms of nanosilver-induced toxicological effects: more attention should be paid to its sublethal effects // *Nanoscale.* 2015. DOI: 10.1039/C5NR01133G.