

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ И СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

УДК 615.916,504.05,620.3

АНОМАЛЬНО ВЫСОКОЕ НАКОПЛЕНИЕ СЕРЕБРА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ, ЛЕГКИХ И ТЕСТИКУЛАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ПРИЕМЕ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА

© 2022 г. А. А. Анциферова^{1, *}, М. Ю. Копаева¹, В. Н. Кочкин¹, П. К. Кашкаров^{1, 2}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: antsiferova_aa@nrcki.ru

Поступила в редакцию 14.12.2021 г.

После доработки 14.01.2022 г.

Принята к публикации 17.01.2022 г.

Серебро известно с древних времен благодаря своим выраженным бактерицидным, противовирусным и фунгицидным свойствам. В настоящее время в пищевой, легкой и фармацевтической промышленности, а также медицине нашли широкое распространение наночастицы этого металла. Серебро в любой форме способно оказывать токсическое действие не только на патогены, но и на здоровые клетки. Биологическая активность и доступность препаратов серебра зависят от степени их растворимости в воде. При этом предельно допустимая концентрация растворимых форм серебра на порядок ниже, чем для нерастворимых. Это делает наночастицы серебра с гидрофильной стабилизирующей оболочкой потенциально небезопасными объектами. Изучены кинетики накопления наночастиц серебра размером 34 ± 5 нм, стабилизированных поливинилпирролидоном, в организме лабораторных мышей линии C57Bl/6. Введение наночастиц осуществляли перорально в течение 30, 60, 120 и 180 сут. Определение содержания серебра в биологических тканях млекопитающих проводили методом инструментального нейтронно-активационного анализа. Установлены массы и концентрации серебра в головном мозге, легких, тестикулах, печени, крови, почках, селезенке и сердце. Показаны экстремально высокое накопление серебра в тестикулах на сроках введения от 120 сут, значительное накопление серебра в легких и головном мозге. Обнаружен эффект вымывания серебра из печени при введении его наночастиц в течение 180 сут.

DOI: 10.56304/S2782375X22010053

ВВЕДЕНИЕ

Серебро известно с древних времен благодаря своим антисептическим свойствам. Его применяли в медицинских целях еще в Древнем Египте и Месопотамии. Так, в индусской аюрведической литературе упоминается об обеззараживании воды путем погружения в нее раскаленного серебра либо при длительном контакте с металлическим серебром при нормальных условиях [1]. Также упоминается эффективное использование свойств серебра рыцарями ордена Госпитальеров в XVI веке во время неудачной попытки захвата острова Мальта турками-османами [2]. Госпитальеры особое внимание уделяли гигиене: они отдавали предпочтение большим проветриваемым помещениям и посуде из серебра, в то время как турецкая армия использовала деревянную посуду. Рыцари намеренно отравили питьевую воду в колодцах на подступах к их территории трупами мертвых животных и турецких воинов. Среди

османов начали распространяться кишечные инфекции, которые значительно ослабили их военный потенциал, в итоге туркам пришлось отступить, оставив остров. Так, до 1800 г. известны факты использования исключительно металлического серебра. Однако позднее стали применять его соли и коллоидные растворы (аргирол, протаргол). С начала 2000-х гг. в связи с развитием нанотехнологий начали активно использовать наночастицы серебра (НЧ Ag) в пищевой, фармацевтической и легкой промышленности, а также в медицине [3]. В настоящее время особенно востребованными являются биологически активные добавки и раневые повязки на основе НЧ Ag [4, 5].

В целом серебро в любых формах проявляет антибактериальные, противовирусные и фунгицидные свойства. Однако токсические свойства серебра и, в частности, его наночастицы могут проявлять не только в отношении патогенов, но и

здоровых клеток [6, 7]. По сути биологическая активность и токсичность неразрывно и прямо пропорционально связаны. Сейчас понятен тот факт, что биологическая активность препаратов серебра зависит от степени их растворимости, так как в организме они в значительной степени взаимодействуют с водной фазой. Предлагается различать предельно допустимые дозы содержания серебра в воде с учетом способности к образованию водородных связей соответствующих соединений. Так, максимально допустимая концентрация для металлического серебра составляет 0.1 мг/м^3 , тогда как для растворимых его форм — 0.01 мг/м^3 [8]. Таким образом, переход к растворимой форме, например к коллоидным растворам, повышает биодоступность серебра, а также усиливает его токсичность. Поэтому особое внимание следует уделять устойчивым растворам НЧ Ag, покрытых гидрофильной стабилизирующей оболочкой.

Токсичность серебра связывают со взаимодействием его ионов с отрицательно заряженными группами в клеточных биомолекулах [9]. При этом считается, что механизмы токсического действия ионной и наночастиц различны. Наночастицы могут увеличивать проницаемость клеточной мембраны [10], а также выступать в качестве депо ионов. В итоге НЧ Ag могут приводить к нарушению метаболизма клетки, генетическим изменениям и апоптозу. Принято считать, что НЧ Ag приводят к генерации активных форм кислорода, которые и вызывают перечисленные неблагоприятные процессы [11].

В клинической практике известно такое состояние, как аргироз [12], которое может реализоваться при длительном экспонировании серебром, в том числе в наночастицах, например, при лечении трофических язв и других гнойных поражений кожи. Оно представляет собой изменение цвета кожных покровов и слизистых оболочек. В целом аргироз является выраженным косметическим дефектом. Длительное экспонирование серебром и его наночастицами в относительно высоких дозах может реализоваться при рециркуляции серебра в экосфере. Например, в трофических цепях при введении удобрений на основе наносеребра в агропромышленный комплекс. Понимание процессов, реализующихся при взаимодействии серебра в наночастицах с биологическими организмами крайне важно в связи с его активным использованием и внедрением в экосферу и биосферу.

Для оценки токсичности серебра весьма важны данные о его бионакоплении в различных органах. В наших предыдущих исследованиях впервые был обнаружен экстремально низкий уровень выведения НЧ Ag из головного мозга [13]. Поэтому было принято решение о продолжении

данных исследований и проведении более подробного рассмотрения различных тканей организма. Настоящая работа посвящена изучению кинетики накопления серебра в организме лабораторных млекопитающих при длительных сроках пероральной экспозиции наночастицами серебра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника НЧ Ag использовали коммерчески доступную биологически активную добавку “Арговит С” с исходной концентрацией 10 мг/мл (ООО НПЦ “Вектор-Вита”, Россия). Частицы были стабилизированы гидрофильным полимером поливинилпирролидоном. Размер наночастиц определяли методом динамического рассеяния света (ДРС, Malvern Zetasizer, Великобритания). Также изучали устойчивость препарата после хранения в темноте при температуре $+2^\circ\text{C}$ в течение 1 года методом ДРС.

В качестве модели млекопитающих использовали мышей-самцов линии C57Bl/6 с исходной массой тела $20\text{--}22 \text{ г}$, начиная с возраста 2 мес, которые были получены из Филиала “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

В качестве питьевой воды и для приготовления растворов наночастиц использовали очищенную воду “ОСМОТЕК” 40-30-2 (ООО “Фармсистемы”, Россия).

Массу накопленного во внутренних органах серебра определяли методом инструментального нейтронно-активационного анализа с использованием ядерного исследовательского реактора ИР-8 (Москва, Россия) мощностью 8 МэВ и гамма-спектрометра (ORTEC, США).

Для приготовления эталонных образцов использовали раствор государственных стандартных образцов (ГСО) серебра в форме нитрата серебра с концентрацией ионов 1 г/л (ЛенРеактив, Россия).

СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для исследования наночастиц методом ДРС подбирали концентрацию растворов, обеспечивающую 10-кратное воспроизведение результатов. Для этого раствор разбавляли деионизованной водой в 50 раз.

В течение всего эксперимента животных содержали в индивидуальных клетках с неограниченным доступом к пище и воде в помещениях с автоматическим поддерживаемыми температурой $23 \pm 2^\circ\text{C}$ и 12/12-часовым циклом день/ночь. Также в помещении контролировали влажность воздуха $45 \pm 10\%$. Осуществляли еженедельный контроль массы тела животных.

Мыши были разделены на четыре группы по срокам введения наночастиц: 30, 60, 120, 180 сут. Каждая из этих групп также была разделена на две подгруппы: экспериментальную и контрольную. В каждой из подгрупп, относящихся к группам 30, 60 и 120 сут, было по 6 животных, к группе 180 сут – по 8 животных.

Наночастицы вводили ежедневно перорально в количестве 50 мкг/сутки/животное в составе питьевой воды. Для определения уровня потребляемой жидкости поилки еженедельно взвешивали.

По истечении указанных сроков введения наночастиц животных подвергали декапитации после наркотизации изофлураном (Baxter, США). У мышей отбирали головной мозг, легкие, тестикулы, печень, почки, кровь, сердце и селезенку.

Для облучения в канале ядерного реактора образцы тканей высушивали в сушильном шкафу в течение 72 ч при температуре 75°C. После этого помещали в полиэтиленовые контейнеры (Eppendorf, Германия) объемом 0,2, 0,5 и 2 мл, герметично закрывали и нумеровали влагоустойчивым маркером.

Одновременно готовили эталонные образцы с целью проведения инструментального нейтронно-активационного анализа по относительному методу. Для этого в такие же пластиковые контейнеры (для соблюдения идентичности форм-фактора) помещали хлопчатобумажную вату и добавляли известное количество ГСО серебра (100 нг). Контейнеры оставляли открытыми и высушивали на воздухе в течение 48 ч, после этого герметично закрывали. Также готовили плоские эталонные образцы. Для этого на бумажные диски помещали известное количество ГСО серебра и высушивали на воздухе. Далее экспериментальные и эталонные образцы помещали в алюминиевые пеналы. Каждый алюминиевый пенал содержал один эталонный образец с таким же форм-фактором, как и у экспериментальных образцов, а также 84 плоских эталонных образца.

Алюминиевые пеналы подвешивали в вертикальном канале ядерного реактора и облучали в течение 24 ч в потоке нейтронов 10^{12} шт/см² · с. После облучения пеналы выдерживали в биозащите для распада высокоактивных короткоживущих изотопов и после этого проводили гамма-спектрометрические исследования образцов по активностям радиоактивного изотопа ^{110m}Ag с периодом полураспада 250 сут.

Отметим, что нейтронно-активационный анализ является уникальным инструментом для исследования биокинетики небиоэссенциальных наночастиц, так как позволяет получать результаты с метрологической точностью и чувствительностью до 10^{-9} г, а также регистрировать сигналы по активности от целых органов лабораторных

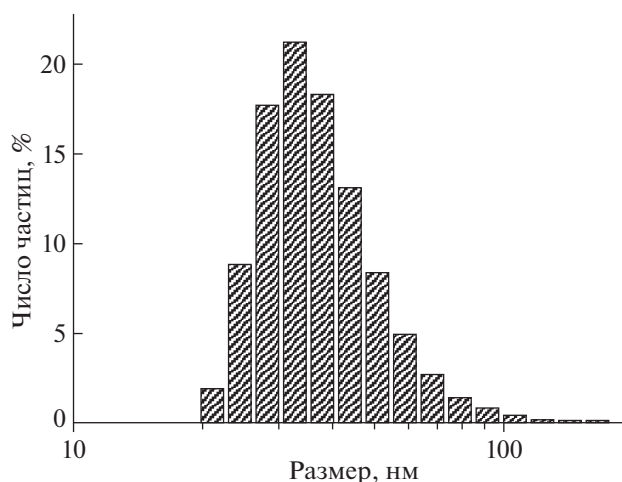


Рис. 1. Распределение числа частиц по размерам согласно данным ДРС. Средний размер частиц составил 34 ± 5 нм.

млекопитающих, а не только их частей в отличие от большинства известных методов элементного анализа. Таким образом, он является высокочувствительным и интегральным.

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, США) с использованием непараметрического теста Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным ДРС (рис. 1) средний размер наночастиц составил 34 ± 5 нм. Продемонстрирована высокая устойчивость суспензии наночастиц “Арговит С”, так как после хранения в течение 1 года, средний размер частиц остался прежним в пределах погрешности измерения.

Удельная масса органов животных, получавших НЧ Ag, не отличалась от массы органов контрольных животных, за исключением массы легких для групп “30 суток” и “180 суток”, у которых средняя удельная масса была ниже, чем у контроля (рис. 2). Содержание серебра в контрольных образцах было ниже предела детектирования, поэтому кривые накопления были проведены из начала координат.

В табл. 1 представлены значения содержания серебра во внутренних органах. Как видно из таблицы, массы серебра в ряде органов составляют десятки нанограмм, являясь весьма малыми величинами. Содержание серебра в большинстве образцов сердца, почек и селезенки оказалось ниже предела детектирования, что не позволило провести статистическую обработку результатов.

Наибольшее абсолютное содержание серебра, как можно заметить, наблюдалось в тестикулах. Концентрации серебра в тестикулах также имели

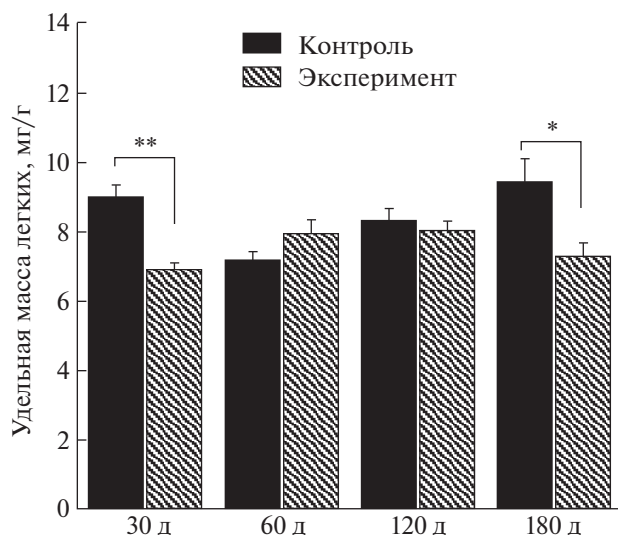


Рис. 2. Масса легких животных экспериментальных и контрольных групп. Как видно из гистограммы, легкие животных, получавших наночастицы, для 30 и 180 сут их введения имели статистически значимо меньший вес по сравнению с контролем.

весьма высокие значения для сроков введения 120 и 180 сут (рис. 3а). Высокие концентрации серебра наблюдались также в легких и головном мозге.

В крови и печени концентрации серебра были минимальными, что может быть связано с его быстрым вымыванием из этих органов [13] благодаря наличию большого количества клеток иммунной системы и сравнительно быстрому метаболизму. В первые же дни введения НЧ Ag наибольшие концентрации серебра наблюдаются именно в печени [14]. Однако, как видно из рис. 3б, через 180 сут введения концентрация серебра в печени даже снижалась, что свидетельствует о его вымывании. Наибольшие концентрации серебра в крови наблюдаются в первые часы введения при острой экспозиции [15]. Быстрый обмен между органами обуславливает ее быстрое очищение от потенциального токсина. Так, в [13] было показано, что после двухмесячного перорального введения НЧ Ag через 1 мес после его отмены из крови и печени вымывается соответственно 80 и 75% серебра. В то время как из голов-

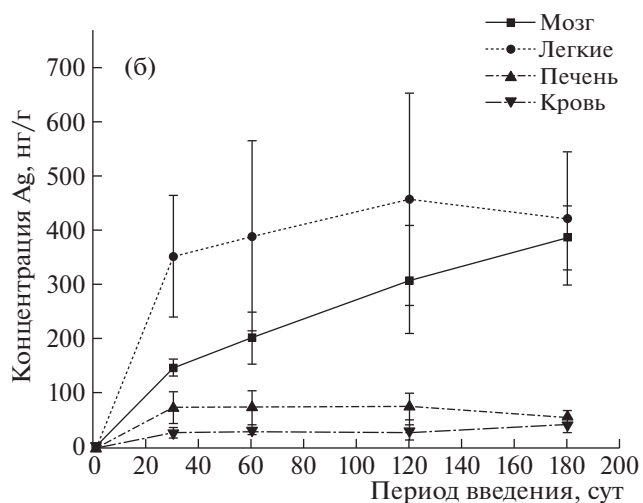
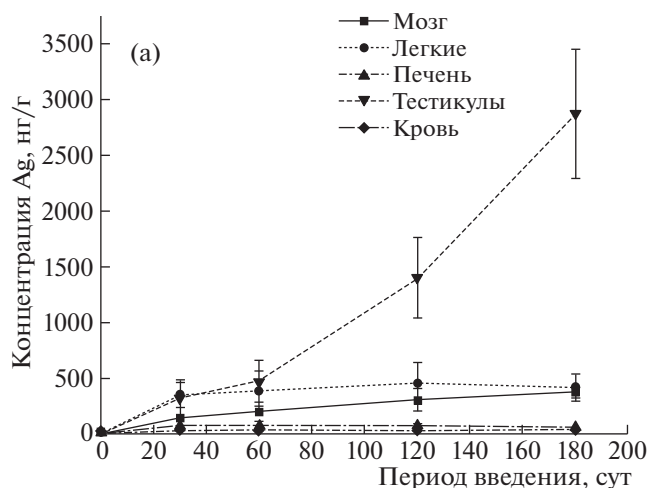


Рис. 3. Зависимость концентрации серебра во внутренних органах от периода введения наночастиц в двух масштабах: а – для всех органов, б – исключены данные для тестикул.

ного мозга всего 5%. Относительно высокие концентрации накопления серебра в головном мозге наблюдаются и при столь длительной экспозиции наночастицами (рис. 3б). Это может быть связано с низкой степенью элиминации из нервной ткани [16, 17].

Таблица 1. Масса серебра во внутренних органах и крови для различных сроков введения наночастиц

Время введения, сут	Масса серебра, нг				
	Головной мозг	Легкие	Тестикулы	Печень	Кровь
30	63.1 ± 5.3	63.7 ± 19.8	61.8 ± 33.2	105 ± 38.3	18.5 ± 5.5
60	84.7 ± 19.1	78.1 ± 34.2	87.8 ± 31.5	102.1 ± 40.9	20.1 ± 3.7
120	137.3 ± 41.2	96.1 ± 38.7	267.8 ± 66.7	113 ± 33.4	19.1 ± 9
180	166 ± 24	89 ± 19.3	519.1 ± 95.4	90.7 ± 15.1	32.2 ± 8.8

При сроках введения от 120 сут наблюдается экстремально высокое накопление серебра в тестикулах, что может быть связано с физиологическими и цитологическими особенностями гемато-тестикулярного барьера, а также низкой степенью элиминации его из этой ткани. Например, в [16] обнаружено, что при 28-дневном введении НЧ Ag крысам через 4 мес после отмены препаратов наблюдался относительно низкий уровень выведения серебра из тестикул. Такой же эффект был обнаружен в [17]. Вероятно, НЧ Ag проникают через гемато-тестикулярный барьер, но в связи с его особенностями, обуславливающими низкую степень элиминации, происходит значительное накопление серебра в тестикулах [17].

На рис. 3б также продемонстрированы относительно высокие концентрации серебра в легких, превышающие концентрации серебра в головном мозге. Эффект значительного накопления НЧ Ag в легких обнаружен и в [18], где мыши были экспонированы НЧ Ag интраперитонеально в течение 21 сут. Он может объясняться хорошим кровоснабжением легких и повышенными обменными процессами в них.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе высокочувствительного и репрезентативного метода инструментального нейтронно-активационного анализа получены кинетики накопления серебра во внутренних органах при длительном (от 1 до 6 мес) пероральном введении НЧ Ag. Обнаружено экстремально высокое накопление серебра в тестикулах, что делает длительный прием НЧ Ag потенциально небезопасным для репродуктивной системы. Также обнаружено значительное накопление серебра в легких и головном мозге. При этом определили, что удельная масса легких животных, экспонированных наночастицами в течение 30 и 180 сут, статистически ниже контрольных значений. Полученный результат свидетельствует о том, что основными органами-мишенями при длительном приеме НЧ Ag являются тестикулы, легкие и головной мозг. При этом обнаружено, что через 180 сут даже при постоянной экспозиции наночастицами серебро вымывается из печени. Также наблюдались относительно низкие концентрации серебра в крови.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 21-315-70016.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Just J., Szniolis A.* // J. Am. Water Works Ass. 1936. V. 28. № 4. P. 492.
2. *Norwich J.J.* The Middle Sea: A History of the Mediterranean. UK: Chatto & Windus, 2006. 667 p.
3. *Antsiferova A.A., Kopaeva M.Yu., Kochkin V.N. et al.* // Toxics. 2021. V. 9. № 30.
4. *Яманова Р.Р., Николаенко Г.Р.* // Вестник Казанского технологического университета. 2013. Т. 16. № 22. С. 39.
5. *Привольнев В.В., Забросаев В.С., Даниленков Н.В.* // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2015. Т. 14. № 3. С. 85.
6. *Smith J.N., Thomas D.G., Jolley H. et al.* // Particle and Fibre Toxicology. 2018. V. 15. 47.
7. *Vazquez-Muñoz R., Borrego B., Juárez-Moreno K. et al.* // Toxicol. Lett. 2017. V. 276 P. 11. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.007>
8. *Drake P.L., Hazelwood K.J.* // Ann. Occup. Environ. Hyg. 2005. V. 49. № 7. P. 575.
9. *Behra R., Sigg L., Clift M.J.D. et al.* // J. R. Soc. Interface. 2013. V. 10. № 87. P. 20130396.
10. *Sun X., Shi J., Zou X. et al.* // J. Hazard. Mater. 2016. V. 317. P. 570.
11. *Lee M.J., Lee S.J. Yun S.J. et al.* // Int. J. Nanomed. 2015. V. 11. P. 55. <https://doi.org/10.2147/IJN.S94907>
12. *Hadrup N., Sharma A.K., Loeschner K.* // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2018. V. 98. P. 257. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.08.007>
13. *Antsiferova A., Buzulukov Yu., Demin V. et al.* // IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 2015. V. 98. P. 012003. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012003>
14. *Jiménez-Lamana J., Laborda F., Bolea E. et al.* // Metallomics. 2014. V. 6. № 12. P. 2242.
15. *Xue Y., Zhang Sh., Huang Y. et al.* // J. Appl. Toxicol. 2012. V. 32. № 11. P. 890.
16. *Lee J.H., Kim Y.S., Song K.S. et al.* // Part Fibre Toxicol. 2013. V. 10. № 36. P. 1.
17. *van der Zande M., Vandebriel R.J., Van Doren E. et al.* // ACS Nano. 2012. V. 6. № 8. P. 7427.
18. *Blanka T.L., Rinea B., Barbara P.* // NanoImpact. 2021. V. 23. P. 100340. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100340>