

УДК [546.57:547.458.88]+615.9+544.77

К ВОПРОСУ О ТОКСИЧНОСТИ НАНОКОМПОЗИТА СЕРЕБРО-ПЕКТИН ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ В ПОДОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Василькевич В.М., Михайлова Н.Н., Эрм Г.И., Афонин В.Ю., Бондаренко Л.М.

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
г. Минск, Республика Беларусь

В эксперименте на аутбредных крысах проведено изучение токсических свойств вновь синтезированного нанокompозита серебро-пектин, перспективного для применения в ветеринарии и медицине. Установлено, что ингаляционное воздействие нанокompозита серебро-пектин вызывает снижение устойчивости клеточных структур к повреждающему действию свободных радикалов, уменьшению активности фагоцитоза, которое сопровождается у животных усилением гуморального иммунного ответа, что повышает естественную резистентность и реактивность организма. Проведенные исследования являются частью токсиколого-гигиенической оценки нового нанокompозита серебро-пектин, выполняемой в рамках задания 02.03 ОНТП «Гигиеническая безопасность».

Ключевые слова: нанокompозит, наночастицы серебра, пектин, интраназальное введение, токсичность.

Для цитирования: Василькевич В.М., Михайлова Н.Н., Эрм Г.И., Афонин В.Ю., Бондаренко Л.М. К ВОПРОСУ О ТОКСИЧНОСТИ НАНОКОМПОЗИТА СЕРЕБРО-ПЕКТИН ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ В ПОДОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ. Медицина труда и экология человека. 2020: 2:85-91

Для корреспонденции: Василькевич Вадим Михайлович, старший научный сотрудник Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены», к.м.н, e-mail: sabas2004@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2020-10213>

TO THE QUESTION OF THE TOXICITY OF SILVER-PECTIN NANOCOMPOSITE UNDER INHALATION EXPOSURE IN A SUBACUTE EXPERIMENT

Vasilkevich V.M., Mikhailava N.N., Erm G.I., Afonin V.Y., Bondarenko L.M.

Republican Unitary Enterprise "Scientific and Practical Centre of Hygiene",
Minsk, Republic of Belarus

The toxic properties of the newly synthesized silver-pectin nanocomposites, which are promising for use in veterinary medicine and medicine, were studied in an experiment on rats. It was found that the inhalation effect of silver-pectin nanocomposite causes a decrease in the resistance of cell structures to the damaging effect of free radicals, a decrease in phagocytosis activity, which is accompanied in animals by an increase in the humoral immune response, which increases the body's natural resistance and reactivity. The conducted studies are part of the toxicological and hygienic assessment of the new silver-pectin nanocomposite performed as part of task 02.03 of the ONTP "Hygienic Safety".

Key words: nanocomposite, silver nanoparticles, pectin, intranasal administration, toxicity.

For citation: Vasilkevich V. M., Mikhailova N. N., Erm G. I., Afonin V. Yu., Bondarenko L. M. TO THE QUESTION OF THE TOXICITY OF SILVER-PECTIN NANOCOMPOSITE UNDER INHALATION EXPOSURE IN A SUBACUTE EXPERIMENT. *Occupational Health and Human Ecology*. 2020: 2:85-91

For correspondence: Vadim M. Mikhailovich, Senior Researcher, Republican Unitary Enterprise "Scientific and Practical Center of Hygiene", MD, Ph.D., e-mail: sabas2004@mail.ru

Financing. The study did not have sponsorship.

Conflict of Interest: Authors declare they have no conflict of interest.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2020-10213>

В настоящее время материалы, состоящие из наночастиц (НЧ) металлов находят широкое применение в медицине и биологии, фармацевтической, парфюмерной и пищевой промышленности, сельском хозяйстве и т.д. Согласно литературным данным, наночастицы могут быть токсичными, в отличие от их эквивалентной обычной формы. Показано, что ингаляция наночастиц вызывает у экспериментальных животных воспалительный процесс в легочной ткани с последующим некрозом клеток и развитием фиброза. Токсичность наноматериалов обусловлена, в первую очередь, развитием окислительного стресса и повреждением ДНК, что может приводить к развитию воспалительной реакции, апоптозу и некрозу клетки. Нельзя исключать, однако, и наличия других механизмов токсичности наноматериалов, связанных, в частности, с их повреждающим действием на клеточные мембраны и органеллы, усилением транспорта потенциально токсичных компонентов через барьеры организма, а также возможной генотоксичностью и аллергизирующим действием [1, 2].

Исторически сложилось, что среди наночастиц металлов наибольший интерес вызывают НЧ серебра, разработка и использование которых охватывает более 100 лет. В настоящее время НЧ серебра синтезируют как физическими, так и химическими методами. При химическом синтезе необходимо вводить токсичные соединения, например восстановители (гидразин, борогидрид натрия) или органические растворители (гексан и др.), что ограничивает возможность применения полученных коллоидов в ветеринарии и медицине. В связи с этим в настоящее время все больше внимания уделяется синтезу НЧ серебра методами «зеленой» химии [3]. Одним из таких способов является восстановление ионов Ag^+ полисахаридами в водных средах, которые обеспечивают стабилизацию образующихся коллоидов Ag^+ . Следует отметить, что синтез и стабилизация НЧ серебра с использованием полисахаридов позволяет также придать коллоиду новые свойства, присущие биополимеру. Так, использование пектина, который обладает высокой адгезией к некоторым биологическим тканям организма животных и человека, открывает дополнительные перспективы в области создания многофункциональных систем доставки биологически активных веществ (пищевые/кормовые добавки, лекарственные препараты) в ветеринарии и таргентной терапии, профилактике и диагностике заболеваний человека.

Цель работы – изучение токсического действия нанокompозита серебро-пектин в подостром эксперименте при ингаляционном пути поступления белым крысам.

Материалы и методы. Объект исследования – нанокompозит в виде устойчивого гидрозоля комплекса серебро-пектин (массовое соотношение пектин: серебро = 10:1), синтезированный в ГНУ НАН Беларуси «Институт химии новых материалов» методом химического восстановления нитрата серебра под действием природного полисахарида пектина. Степень этерификации пектина – 80,4%, (высокометоксилированный пектин). Гидрозоль наносеребра с пектином

характеризовался степенью устойчивости к агрегации не менее 3 месяцев и заданным размером частиц (от 8 ± 2 до 22 ± 6 нм).

Ингаляционное воздействие изучаемого нанокompозита серебро-пектин выполнено на белых крысах с применением модели интраназального введения на протяжении 28 дней в дозе 0,8 мл/кг, что эквивалентно 500 мг/м^3 . Контрольные животные получали пектин. Проведение эксперимента и выведение лабораторных животных из опыта соответствовали принципам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в эксперименте (Хельсинки, 1986 г.).

По окончании воздействия нанокompозита серебро-пектин определяли функциональное состояние нервной системы лабораторных животных, показатели поведенческой реактивности (ориентировочные реакции, двигательную координацию, эмоциональную реактивность, норковый рефлекс) животных в тесте «открытое поле» и по способности суммировать подпороговые импульсы (СПП) [4].

Гематологические показатели и морфологический состав периферической крови (гемоглобин, эритроциты, лейкоциты, лейкоцитарная формула, тромбоциты, цветной показатель) определяли на гематологическом анализаторе «Mindray 5300-Vet». Определение содержания общих липидов в сыворотке крови проводили колориметрическим методом, белка – унифицированным методом по Лоури, мочевины – фотометрическим методом. Активность глутатионтрансферазы (ГТ) в гемолизатах крови лабораторных животных определяли при ферментативном взаимодействии ГТ с 1-хлор-2,4-динитробензолом в присутствии глутатиона восстановленного (GSH) с образованием продукта, имеющего максимум поглощения при длине волны 340 нм. Содержание глутатионфосфат дегидрогеназы (ГФДГ) в гомогенатах печени выявляли по способности фермента катализировать дегидрирование глюкозо-6-фосфата и по восстановлению НАДФ. Активность глутатионредуктазы (ГР) определяли по скорости реакции убыли НАДФН при превращении окисленной формы ГР в восстановленную, GSH – по реакции с 5,5-дитио-бис(-нитробензойной) кислотой, в результате которой образуется окрашенный продукт. О состоянии мочевыделительной системы экспериментальных животных судили по суточному диурезу, содержанию белка, мочевины, хлоридов в моче. Показателями иммунологической реактивности подопытных животных являлись содержание циркулирующих иммунокомплексов и лизоцима, активность комплемента в сыворотке крови, интегральный показатель антибактериальной защиты сыворотки крови. Для оценки кислородного метаболизма в гранулоцитарно-макрофагальных клетках крови использовали наиболее информативную косвенную методику – тест бессубстратного восстановления нитро-синего тетразолия (НСТ) в диформаза (НСТ-тест) с оценкой результатов в процентах возрастания экстинций в опытной пробе по отношению к контрольной и по индексу стимуляции. Для лабораторного определения развития смешанных механизмов II-IV типов аллергических процессов применяли реакцию специфического НСТ-теста гранулоцитов крови (РЧНСТ) при их стимуляции аллергеном.

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с использованием компьютерной программы STATISTICA 10. Данные представлены как медиана, 25-й и 75-й перцентили. Различия в сравниваемых группах считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение.

На протяжении эксперимента при воздействии нанокompозита серебро-пектин, стабилизированного пектином в концентрации 500 мг/м^3 , внешние признаки интоксикации и

гибель животных отсутствовали, что свидетельствует о слабой материальной кумулятивной активности нанокompозита. Однако по окончании эксперимента выявлены изменения ряда клинико-биохимических показателей как проявления токсического действия (табл.).

Таблица

Морфофункциональные показатели состояния крыс при подостром ингаляционном воздействии нанокompозита серебро-пектин

Исследуемые показатели	Контрольная группа, Ме (P25 – P75)	Опытная группа, Ме (P25 – P75)
Физиологические показатели		
СПП, Вольт	1,40 (1,25-1,85)	1,35 (1,15-1,80)
Норковый рефлекс, усл. ед.	1,00 (0,00-4,00)	1,25 (2,00-1,00)
Фризинг, усл. ед.	1,00 (0,00-2,00)	1,30 (1,00-2,50)
Вертикальная стойка, усл. ед.	1,50 (1,00-3,00)	2,00 (1,00-3,00)
Горизонтальная активность, усл. ед.	11,00 (7,00-16,00)	13,00 (9,00-15,00)
Относительные коэффициенты массы внутренних органов, кг⁻³/кг		
Печень	30,29 (29,00-32,62)	28,33 (27,42-30,85)*
Почки	6,76 (6,21-7,06)	6,90 (6,38-7,42)
Селезенка	4,35 (4,16-4,87)	4,76 (3,88-5,16)
Сердце	3,36 (2,94-3,52)	3,94 (3,55-4,05)*
Легкие	7,38 (6,34-8,19)	8,68 (7,42-9,52)
Гематологические показатели периферической крови		
Эритроциты, 10 ¹² /л	7,71 (7,53-7,94)	8,20 (7,95-8,47)*
Гемоглобин, г/л	155,5 (148,5-160,25)	155,0 (152,0-156,0)
Гематокрит	0,42 (0,42-0,44)	0,45 (0,41-0,42)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	14,96 (12,84-17,38)	16,4 (13,76-29,80)
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	743,0 (632,75-794,0)	776,0 (557,0-782,0)
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	2,54 (1,56-2,82)	1,55 (1,23-2,37)
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	10,92 (9,29-17,91)	11,47 (10,05-13,18)
Моноциты, 10 ⁹ /л	1,1 (0,61-1,17)	1,05 (0,9-1,84)
Эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,78 (0,70-1,02)	1,0 (0,83-1,06)
Базофилы, 10 ⁹ /л	0,07 (0,05-0,39)	0,19 (0,08-0,21)
Биохимические показатели крови		
Содержание белка, г/л	65,30 (63,40-68,14)	66,19 (62,50-67,20)
Содержание липидов, г/л	3,05 (2,78-3,14)	3,14 (2,78-3,31)
Активность АЛТ, мкМоль/л	0,01 (0,01-0,015)	0,015 (0,01-0,05)
Активность АСТ, мкМоль/л	0,04 (0,04-0,045)	0,04 (0,04-0,04)
Активность ГР, мкМоль/л (мкМоль/гНв мин)	3,18 (2,79-3,31)	3,53 (3,35-4,02)*

Активность ГТ, мкМоль/л (мкМоль/гНв мин)	0,77 (0,7-0,88)	0,67 (0,56-0,78)*
Концентрация SH-групп, мкМоль/л	82,57 (69,27-90,43)	62,9 (61,17-65,76)*
Концентрация ГТ- SH, мкМоль/л	11,64 (9,77-12,75)	8,87 (8,62-9,27)*
Активность ГФДГ, мкмоль НАДФН/мин × гНв	80,9 (70,0-85,75)	65,18 (42,31-105,08)
Концентрация СОД, мкг/мл	0,75 (0,71-,079)	0,77 (0,74-0,81)
Концентрация мочевины, ммоль/л	5,15 (4,11-6,33)	5,76 (5,02-6,04)
Иммунологические показатели		
ЦИК, усл.ед.	57,00 (54,0-57,0)	58,5 (49,75-62,75)
Лизоцим, %	62,5 (53,8-64,60)	47,35 (45,05-48,72)*
БАСК, %	19,50 (18,40-26,95)	34,05 (30,07-49,6)*
Величина фагоцитарного резерва, %	25,90 (22,30-61,90)	35,62 (32,17-43,31)
Реакция специфического лейколизиса, %	8,65 (6,79-10,77)	18,20 (15,4-23,5)*
НСТ-тест:		
Спонтанный ур.: -к контр. пр., %	19,00 (14,30-25,40)	24,00 (19,58-29,26)
Зн-стимулир. ур.: - к контр. пр., %	51,50 (41,30-76,80)	59,65 (54,13-63,98)
-индекс стим., ед.	1,23 (1,19-1,49)	1,82 (1,46-1,94)
РСНСТ-тест:		
– отн. уровень, %	24,20 (18,20-34,50)	24,64 (18,23-29,35)
– индекс стимул., ед.	1,01 (0,96-1,13)	1,13 (1,08-1,19)
Показатели функционального состояния почек		
Диурез, л ⁻³ /сут.	4,00 (3,75-4,25)	4,22 (3,95-4,42)
рН мочи	6,75 (6,53-6,97)	6,11 (6,02-6,19)
Белок, г/л	0,1 (0,1-0,3)	0,1 (0,1-0,2)
Мочевина, ммоль/л	195,1 (189,3-200,9)	202,2 (196,0-216,5)
Хлориды, ммоль/л	9,19 (9,00-9,41)	10,08 (8,98 – 11,10)

* статистически значимые различия по критерию Манна-Уитни (U) при $p < 0,05$.

Так, прирост массы тела подопытных животных оказался в 2,6 раза ниже аналогичного показателя в контроле. Функциональное состояние нервной системы белых крыс на фоне ингаляционного воздействия наночастиц серебра не изменилось по сравнению с контрольными животными.

Со стороны относительных коэффициентов масс внутренних органов обнаружено статистически значимое снижение массы печени 6,5% ($p < 0,05$) и увеличение массы сердца 17%

($p < 0,05$). Среди гематологических показателей выявлен рост числа эритроцитов на 6% ($p < 0,05$), что находится в пределах колебаний физиологической нормы.

Среди биохимических показателей крови основные изменения обнаружены со стороны системы глутатиона: увеличение активности ГР на 11% ($p < 0,05$), а также выраженное снижение активности ГТ на 13% ($p < 0,05$), SH-групп и ГТ-SH на 24% ($p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что рост активности фермента ГР, обеспечивающего восстановление окисленной формы глутатиона, не может компенсировать расход ГТ-SH.

Важно отметить, что SH-группы способны вступать в реакцию конъюгации с электрофильными центрами различных токсикантов и ксенобиотиков, обеспечивая детоксикацию продуктов окислительного стресса (активные формы кислорода – АФК, перекиси). Кроме предотвращения образования АФК и обеспечения благоприятного микроокружения для эффективного действия антиоксидантов, ГТ совместно с ГТ-SH принимают участие в эпигенетической редокс-регуляции чувствительности клеток к апоптозу.

Учитывая установленные биохимические сдвиги в системе глутатиона, можно предположить, что интраназальное подострое введение нанокompозита серебро-пектин способно приводить к нарушению процессов поддержания редокс-потенциала клеточных мембран и способствовать снижению устойчивости клеточных структур к повреждающему действию свободных радикалов.

Анализ других биохимических показателей сыворотки крови подопытных белых крыс (белок, липиды, АСТ, АЛТ) не выявил статистически значимых изменений по сравнению с интактными крысами.

Со стороны иммунной системы наблюдается падение содержания в сыворотке крови лизоцима на 24% ($p < 0,05$), что свидетельствует об уменьшении активности фагоцитоза. В то же время увеличилась на 74% бактерицидная активность сыворотки крови, интегральный показатель специфического иммунитета, что можно расценить как положительный эффект действия нанокompозита серебро-пектин в виде активации формирования гуморального иммунного ответа и повышения естественной резистентности и реактивности организма.

Признаков токсического действия нанокompозита на функциональное состояние почек не обнаружено.

Выводы. Нанокompозит серебро-пектин в условиях 28-дневного ингаляционного воздействия в концентрации 500 мг/м^3 (на модели интраназального введения) не обладает кумулятивными свойствами на уровне смертельных эффектов, но вызывает снижение устойчивости клеточных структур к повреждающему действию свободных радикалов. Действие на иммунный статус проявляется снижением активности фагоцитоза с одновременным процессом активного формирования гуморального иммунного ответа.

Список литературы:

1. Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов [Электронный ресурс]: постановление Гл. гос. санитар. врача РФ от 31.10.2007 № 79. КонсультантПлюс. Россия. ЗАО «КонсультантПлюс». М.: 2019.

2. Глущенко Н.Н., Богословская О.А., Ольховская И. П. Физико-химические закономерности биологического действия высокодисперсных порошков металлов. Химическая физика. 2002; Т. 21: № 4: 79–85.
3. Green synthesis of silver nanoparticles mediated by *Pulicaria glutinosa* extract / Khan [et al.] *Int. J. Nanomedicine*. 2013; Vol. 8: 1507–1516.
4. Маркель А. Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте «открытого поля». А. Л. Маркель. Журн. высш. нерв. деятельности. 1993; № 1: 150–156.

References:

1. The approval of the Concept of toxicological studies, risk assessment methodology, identification methods and quantitative determination of nanomaterials [Electronic resource]: Resolution of Ch. State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated October 31, 2007; No. 79. ConsultantPlus. Russia. CJSC ConsultantPlus. M., 2019.
2. Glushchenko N.N., Bogoslovskaya O.A., Olkhovskaya I.P. Physicochemical laws of the biological action of finely divided metal powders. *Chemical Physics*. 2002; Vol. 21(4): 79–85.
3. Green synthesis of silver nanoparticles mediated by *Pulicariaglutinosa* extract. Khan [et al.]. *Int. J. Nanomedicine*. 2013; Vol. 8: 1507–1516.
4. Markel, A. L. The assessment of the main characteristics of rats' behavior in the "open field" Test. A. L. Markel. *Jour. higher nerve activity*. 1993; No. 1: 150–156.
UDC 615.322+ [635.72 + 635.71] -26.86

Поступила/Received: 21.05.2020

Принята в печать/Accepted: 03.06.2020