

УДК 612.014.44:535.37:[546.57:544.777

Л.І. Власик,
Н.Й. Андрійчук,
І.С. Давиденко

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці

ОЦІНКА ТОКСИЧНОЇ ДІЇ СРІБНИХ НАНОДЕКАЕДРІВ ЗА ДАНИМИ ЛЮМІНЕСЦЕНТНОЇ МІКРОСКОПІЇ

Ключові слова: наночастинки срібла, інтенсивність люмінесценції, додозалежність.

Резюме. Проведена оцінка інтенсивності люмінесценції у препаратах внутрішніх органів щурів, що виникли внаслідок внутрішньочеревинного введення розчину наночастинок срібла декаедричної форми упродовж 14 днів. Спостерігалось збільшення інтенсивності світіння препаратів, що свідчить про додозалежне накопичення НЧС у нирках, печінці, серці, легенях та головному мозку. Крім цього, виявлено статеву залежність накопичення НЧС у нирках, а саме, інтенсивність люмінесценції на 6-8 ум.од. більша у епітелії звивистих каналців нирок самок, ніж у самців.

Вступ

Наночастки срібла (НЧС) за звичай менші 100 нм та включають в себе 20-15000 атомів срібла. В нанорозмірі срібло володіє особливими фізичними, хімічними та біологічними властивостями [6]. Враховуючи маленькі розміри, загальна площа НЧС максимально збільшена, відповідно збільшуючи активність срібла у співвідношенні до ваги [10].

Аналіз даних літератури свідчить, що наночастки срібла, порівняно зі звичайними мікрочастками, володіють не тільки більш вираженою фармакологічною активністю і токсичністю, здатні проникати в незміненому вигляді через клітинні бар'єри, через гематоенцефалічний бар'єр в центральну нервову систему, циркулювати і накопичуватися в органах і тканинах, викликаючи більш виражені патоморфологічні зміни у внутрішніх органах, а також мають тривалий період напіввиведення [1,4]. При впливі наночастинок срібла на організм чітко простежується зв'язок "доза - ефект" [3, 5]. Токсичність наночастинок залежить від їх розмірів і форми [4].

В літературі описані дослідження гострої, підгострої та субхронічної токсичності наносрібла сферичної форми різних розмірів, введеного щурам, мишам або морським свинкам ін'єкційно, внутрішньошлунково, внутрішньоочеревинно, трансдермально та інгаляційно [1]. При дослідженні розподілу НЧС у внутрішніх органах тварин спостерігали додозалежну концентрацію наносрібла у крові, шлунку, мозку, печінці, нирках, легенях та яєчках [8,13, 14, 15]. Виявлено статевозалежне накопичення наносрібла в нирках [7, 11,12].

Локалізацію та відносну концентрацію люмінесцентних НЧС у внутрішніх органах можливо встановити за допомогою люмінесцентного мікроскопа. Співвідношення розсіювальної та поглинаючої здатності залежить від розміру металевих частинок. Для металевих частинок з розмірами більше 30 нм розсіювальна здатність стає домінуючою. Інтенсивне розсіювання світла робить можливою візуалізацію нанодекаедрів срібла за допомогою мікроскопії темного поля [9]. Хоча роздільна здатність оптичного мікроскопа і не дозволяє візуалізувати форму та розміри наночастинок безпосередньо, проте на мікрофотографіях, одержаних за допомогою цієї техніки, нанодекаедри помітні у вигляді яскравих точок зеленого кольору [2].

Незважаючи на широке застосування наносрібла в побуті, медицині та багатьох сферах промисловості, дослідження їх безпечності відстає в часі, бракує інформації щодо шкідливого впливу наночастинок срібла декаедричної форми.

Метою дослідження

Проведення оцінки інтенсивності люмінесценції у внутрішніх органах щурів, що зазнали під гострого впливу *in vivo* НЧС декаедричної форми, отриманих методом фотостимульованого синтезу.

Матеріали і методи

Досліди проводили на 80 статевозрілих щурах обох статей з дотриманням вимог біоетики, відповідно до "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2011), які узгоджені з положенням Європейської Конвенції щодо

захисту хребетних тварин, які використовуються з дослідницькими та іншими цілями (Страсбург, 1986). Евтаназія тварин здійснювалася згідно з діючими рекомендаціями та етичними стандартами у стані глибокого наркозу згідно до закону України № 3447-1 від 21.02.2006 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження".

Чотирьом групам тварин (по 16 щурів у кожній, по 8 тварин в підгрупі - за статевою належністю) щоденно протягом 14 днів внутрішньочеревинно вводили розчин НЧС в концентраціях 10, 5, 1 та 0,1 мг/кг. П'ята група -біологічний контроль. На 14 день тварин було виведено з експерименту шляхом декапітації під легким ефірним наркозом.

Наносрібло отримували шляхом хімічного відновлення іонів Ag⁺ натрій боргідридом у присутності натрію цитрату та поліакрилової кислоти, далі здійснювали фотохімічний вплив матрицею світлодіодів з довжиною хвилі 470нм [2]. Дослідження просвічуваної електронної мікроскопії показали, що отримані наноматеріали мають структуру плоских декаєдрів з поперечним діаметром близько 45нм та висотою 30-40 нм. В якості стабілізатора використовували полівініл-

піролідон.

Інтенсивність люмінесценції у зеленому діапазоні визначали за допомогою комп'ютерної мікроденситометрії за шкалою 256 градацій (від 0 до 255 ум.од.) у комп'ютерній програмі GIMP (вільна ліцензія, версія 2.82) на цифрових мікрофотографіях, які отримані за допомогою мікроскопа ЛЮМАМ-Р8 та цифрової камери Olympus-SP550UZ.

Обговорення результатів дослідження

Проведені дослідження внутрішніх органів піддослідних тварин 4 (за дози 0,1 мг/кг) та 5 груп (контроль) свідчать про ледь виражену люмінесценцію (можливо, спонтанну), виміряти її було неможливо, оскільки таке слабке світіння не фіксувала матриця цифрової камери навіть при ISO 6400. Водночас відмічена виражена дозозалежна інтенсивність люмінесценції у внутрішніх органах тварин 1 (за дози 10 мг/кг), 2 (5 мг/кг) та 3 (1 мг/кг) груп, а саме у нирках, серці, печінці, легенях та головному мозку. При дослідженні ниркової тканини помічена статеві залежність, що характеризувалася більш інтенсивним світінням у препаратах нирок самок щурів (табл.1).

Таблиця 1

Середня інтенсивність люмінесценції в епітелії звивистих каналців нирки

Доза розчину НЧС, мг/кг	Середня інтенсивність люмінесценції в епітелії звивистих каналців нирки, ум.од.	
	самки	самці
0,1	-	-
1	92,0±1,8	84,0±1,8
5	90,0±1,9	82,0±1,9
10	67,0±1,6	61,0±1,5

При дослідженні тканини нирки 1, 2 та 3 груп виявлено чітку дозозалежну інтенсивність люмінесценції. Так, інтенсивність світіння в епітелії звивистих каналців нирки становила у середньому 88,0±1,4, 86,0±1,7 та 64,0±1,4 ум.од. відповідно, хоча відмічалися окремі каналці з більш інтенсивним світінням - до 134-148 (1 група) та 131-144 (2 група) ум.од. (Рис.1). При чому, відмічена статеві відмінність по епітелію звивистих каналців, а саме інтенсивність люмінесценції на 6-8 ум.од. більша у препаратах нирок самок, ніж у самців (табл.1). У клубочках інтенсивність люмінесценції зафіксована із середнім значенням 58,0±0,9, 57,0±1,1 та 55,0±1,4 ум.од. відповідно.

Огляд препаратів печінки 1, 2 та 3 груп також свідчить продозозалежний розподіл НЧС. Так, інтенсивність люмінесценції у зеленому діапазоні

згідно комп'ютерної мікроденситометрії в гепатоцитах становила 57,0±0,9, 57,0±1,4 та 44,0±1,2 ум.од., в стінці кровоносних судин портальних трактів та центральних вен - 128,0±2,2, 126,0±2,5 та 45,0±1,7 ум.од. відповідно, з максимальною концентрацією на поверхню препаратів 1 та 2 груп (Рис.2).

Дослідження серцевої тканини вказують, що інтенсивність люмінесценції в кардіоміоцитах міокарда складала 54,0±0,8 ум.од. в 1 та 2 групах, і 41,0±1,6 ум.од. в 3 групі (Рис.3).

При огляді легеневої тканини піддослідних тварин 1, 2 та 3 груп виявлено дозозалежне світіння. Так, інтенсивність люмінесценції в альвеолоцитах даних препаратів становила 59,0±1,2, 58,0±1,4 та 48,0±1,2 ум.од., а в епітелії бронхів - 68,0±1,5, 64,0±1,9 та 48,0±1,3 ум.од.

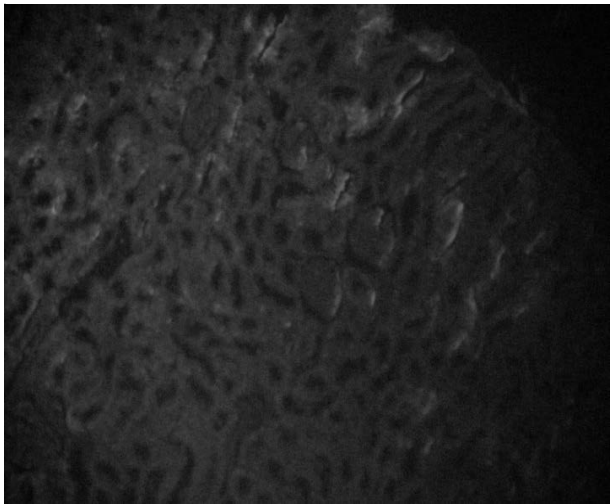


Рис. 1. 1 група дослідження. Нирка щура. Люмінесценція нефарбованого гістологічного парафінового зрізу до депарафінізації. Мікрофотографія. Об.Л20х. Ок.10х.

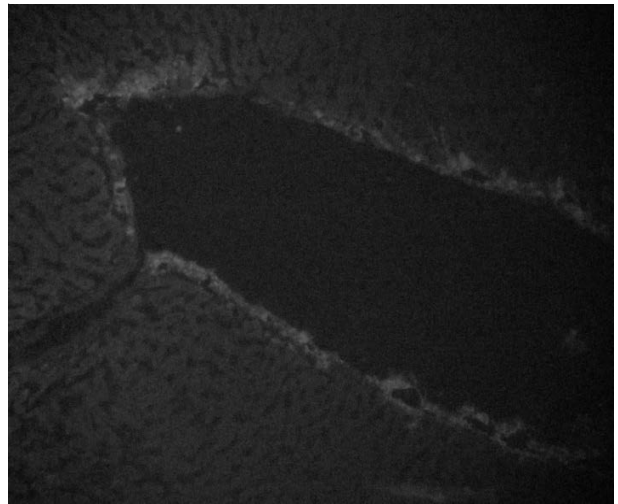


Рис. 2. 1 група дослідження. Печінка щура. Люмінесценція нефарбованого гістологічного парафінового зрізу до депарафінізації. Мікрофотографія. Об.Л20х. Ок.10х.



Рис. 3. 1 група дослідження. Серце щура. Люмінесценція нефарбованого гістологічного парафінового зрізу до депарафінізації. Мікрофотографія. Об.Л20х. Ок.10х.

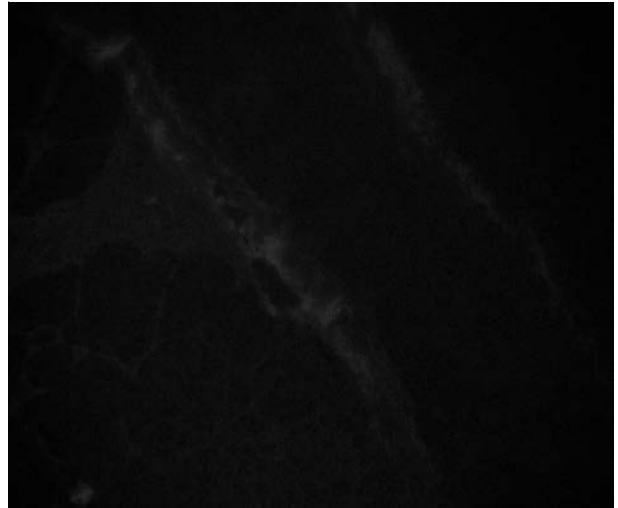


Рис. 4. 1 група дослідження. Легеня щура. Люмінесценція нефарбованого гістологічного парафінового зрізу до депарафінізації. Мікрофотографія. Об.Л20х. Ок.10х.

відповідно (Рис.4).

Інтенсивність люмінесценції у зеленому діапазоні згідно комп'ютерної мікроденситометрії в тканині мозку (клітини ідентифікувати неможливо) становила $28,0-29,0 \pm 0,6$ ум.од. (Рис.5).

Висновки

1. За допомогою люмінесцентної мікроскопії встановлено дозозалежне накопичення НЧС декаедричної форми розміром 45 нм у внутрішніх органах лабораторних щурів. Інтенсивність люмінесценції зростає в ряду: печінка, нирки, легені, серце та головний мозок.

2. Виявлено статеву залежність накопичення НЧС у нирках, а саме, інтенсивність люмінесценції на 6-8 ум.од. більша у епітелії звивистих каналців нирок самок, ніж у самців.



Рис. 5. 1 група дослідження. Головний мозок щура. Люмінесценція нефарбованого гістологічного парафінового зрізу до депарафінізації. Мікрофотографія. Об.Л20х. Ок.10х.

Література. 1.Бойчук Т.М. До проблеми оцінки токсичності наночастинок срібла / Т. М. Бойчук, Н. Й. Андрийчук, Л. І. Власик // Клінічна та експериментальна патологія. - 2012. - Т.ХІ, №4(42). - С. 151-158. 2.Ліка А.І. Фотостимульоване відновлення йонів Аргентуму з утворенням декаедричних наночастинок / А.І. Ліка, І.А. Чікірка, Ю.Б Халавка // Науковий вісник Чернівецького університету. - 2011. - Вип. 555.: Хімія. - С. 40-43. 3.Москаленко В. Ф. Екологічні і токсиколого-гігієнічні аспекти біологічної безпеки наночастинок, наночастинок та наноматеріалів (аналітичний огляд) / В. Ф. Москаленко, О. П. Яворовський // Науковий вісник Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. - 2009. - № 3. - С. - 25-35. 4.Наноматеріали: стан та перспективи наукових досліджень у морфології / О.О. Савенкова, В.Ф. Шаторна, І.С. Чекман та ін. // Вісник ЛНУ ім. Т. Шевченка. -2011. -№ 18 (229). - С. 151-158. 5.Проданчук Н.Г. Нанотоксикологія: состояние и перспективы исследований / Н. Г. Проданчук, Г.М. Балан / Современные проблемы токсикологии. - 2009. - № 3-4. - С. 4-20. 6.Chen X. Nanosilver: A nanoparticle in medical application / X. Chen, H. J. Schluesener // Toxicology Letters. - 2008. - No 176. - P. 1-12. 7.In vivo Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure / J. S. Kim, J. H. Sung, J. H. Ji // Safety and Health at Work. - 2011. - Vol. 2. - P. 34-38. 8.Lung Function Changes in Sprague-Dawley Rats After Prolonged Inhalation Exposure to Silver Nanoparticles / J. H. Sung, J. H. Ji, J. U, Yun et al. // Inhalation Toxicology. - 2008. - Vol. 20. - P. 567-574. 9.McFarland A. D. Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity / A. D. McFarland and R. P. Van Duyne // Nano Letters. - 2003. - Vol. 3, No. 8. - P. 1057-1062. 10.Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities / Chun-Nam Lok, Chi-Ming Ho, Rong Chen et al. // Journal of Biological Inorganic Chemistry. - 2007. - Vol. 12. - P. 527-534. 11.Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles / J. H. Jung, J. H. Ji, J. D. Park et al. // Toxicological Science. - 2009. - Vol. 108 (2). - P. 452-461. 12.Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles / Y. S. Kim, M. Y. Song, J. D. Park et al. // Particle and Fibre Toxicology. - 2010. - Vol. 7 (20). - P. 1-12. 13.The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes / D. P. K. Lankveld, A. G. Oomen, P. Krystek et al. // Biomaterials. - 2010. - No 31. - P. 8350-8361. 14.Twenty-Eight-Day Inhalation Toxicity Study of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats / Jun Ho Ji, Jae Hee Jung, Sang Soo Kim et al. // Inhalation Toxicology. - 2007. - No. 19. - P. 857-871. 15.Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats / Y.S. Kim, J.S. Kim, H.S. Cho et al. // Inhalation Toxicology. - 2008. - Vol. 20. - P. 575-583.

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОДЕКАЭДРОВ ПО ДАННЫМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Л.И. Власык, Н.Й. Андрийчук, И.С. Давыденко

Резюме. Проведена оценка интенсивности люминесценции в препаратах внутренних органов крыс, вознивших вследствие внутрибрюшинного введения раствора наночастиц серебра (НЧС) в форме декаэдра на протяжении 14 дней. Наблюдалось увеличение интенсивности свечения определенных препаратов, что свидетельствует о дозозависимом накоплении НЧС в почках, печени, сердце, легких и головном мозге. Кроме этого, выявлено половую зависимость накопления НЧС в почках, а именно, интенсивность люминесценции на 6-8 усл.ед. больше в эпителии извилистых канальцев почек самок, чем у самцов.

Ключові слова: наночастиці срібра, інтенсивність люмінесценції, дозозависимість.

ASSESSMENT OF TOXIC EFFECT OF SILVER NANODECAHEDRONS ACCORDING TO LUMINESCENCE MICROSCOPY

L.I. Vlasyk, N.J. Andriychuk, I.S. Davydenko

Abstract. There was carried out the assessment of luminescence intensity in preparation of internal organs of experimental animals as a result of fourteen-day intraperitoneal injections of decahedron-shape silver nanoparticles. It was observed increasing of luminescence intensity of definite preparations that testifies to dose dependence accumulation of silver nanoparticles in kidneys, liver, heart, lungs and brain. Besides these, gender-related accumulation of silver nanoparticles was revealed in kidneys, i.e. luminescence intensity was 6-8 reference units higher in epithelium of kidney's convoluted tubules of female rats than male rats.

Key words: silver nanoparticles, luminescence intensity, dose-relation.

Bukovinian State Medical University

Clin. and experim. pathol. - 2014. - Vol.13, №4 (50).-P.09-12.

Надійшла до редакції 15.12.2014

Рецензент – проф. І.І.Заморський

© Л.І.Власик, Н.Й. Андрийчук, І.С. Давыденко, 2014