

МЕДИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА: ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ АСПЕКТ

¹І.С. Чекман, д.мед.н. член-кор. НАН і НАМІ України, ¹А.О. Прискока, ²В.Ф. Бабій, к. мед. н.,
¹О.В. Антоненко, ¹М.І. Загородний, к. мед. н.

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ

²"Інститут гігієни та медичної екології ім. О.М. Марзєєва НАМН України", Київ

РЕЗЮМЕ. В оглядовій статті узагальнено дані публікацій останніх років з токсичного впливу наночастинок срібла на організм людини та тварин, а також культур клітин. У наш час наносрібло активно впроваджується в галузях господарства та повсякденний побут людини. Особливо продукція нанорозмірного срібла знайшла своє використання у медицині. Але токсичні властивості наносрібла та наноб'єктів загалом залишаються маловивченими і потребують подальших глибоких досліджень.

Ключові слова: нанотехнології, наномедицина, наночастинки срібла, токсичність.

РЕЗЮМЕ. В обзорной статье обобщены данные публикаций последних лет по токсическому влиянию наночастиц серебра на организм человека и животных, а также культур клеток. В наше время наносеребро активно внедряется в отрасли хозяйства и повседневный быт человека. Особенно продукция наноразмерного серебра нашла свое применение в медицине. Тем не менее токсические свойства наносеребра и нанобъектов в целом остаются малоизученными и требуют дальнейших глубоких исследований.

Ключевые слова: нанотехнологии, наномедицина, наночастицы серебра, токсичность.

SUMMARY. Recent publications data about toxic effect of silver nanoparticles on human, animals and cell cultures as well are generalized in the review. Nowadays nanosilver is actively incorporated in branches of economy and private life. Especially nanoscale silver production found its application in the field of medicine. Nevertheless, toxicological properties of nanosilver and nanoobjects in general are still not known enough and need further profound research.

Key words: nanotechnology, nanomedicine, silver nanoparticles, toxicity.

Актуальність проблеми. На сьогодні практично всі галузі діяльності людини, включаючи індустрію, хімію, енергетику, електроніку, сільське господарство, біологію, медицину, фармацію, так чи інакше пов'язані з наномасштабними об'єктами, розробленими на основі нанотехнологій [1,2,4,5,7]. Наномедицина і нанофармакологія розвиваються високими темпами, щороку публікується ціла низка наукових робіт, в яких описують нові потенційні лікарські засоби на основі нанотехнологій [6,10,11,12]. Особливе місце серед них займають препарати на основі наночастинок срібла (НЧС) [8,9].

Незважаючи на велику кількість публікацій з даної теми у світовій літературі, порівняно мало уваги приділяють дослідженням токсичності *in vitro* та *in vivo* новостворених наночастинок. Це пов'язано не тільки з тим, що срібло відноситься до важких металів, а також з тим, що об'єкти нанорозмірів можуть виявляти нові, іноді непередбачувані властивості. Дослідження токсичності мають включати експерименти *in vitro* та *in vivo* із встановленням відповідних показників мікроскопічними, біохімічними, імунологічними, гістопатологічними дослідженнями, спостереженнями за поведінкою тварин тощо.

Дослідження токсичності наночастинок срібла *in vitro*. Серед досліджень токсичності препаратів наносрібла переважають досліди *in vitro*. Їх виконували як на культурах малодиференційованих клітин, так і на диференційованих клітинах. У одній з робіт вивчався вплив сферичних наночастинок срібла діаметром 7 — 20 нм на культури клітин фібробластів та гепатоцитів мишей. Згідно з цими дослідженнями цитотоксична дія наночастинок срібла на клітини має місце вже при їх концентрації на рівні 30 мкг/мл та 225 мкг/мл для фібробластів та гепатоцитів відповідно, що проявлялося у проникненні всередину клітин з наступною генерацією оксидативного стресу, зниженням функцій мітохондрій, апоптозом та некрозом клітин. IC_{50} (половина інгібуюча концентрація) визначена на рівні 61 мкг/мл та 449 мкг/мл для фібробластів та гепатоцитів відповідно. Автори вказують на те, що наночастишки срібла здатні проникати всередину клітин і за нижчих концентрацій, однак антиоксидантна система забезпечує захист клітин від ушкодження при концентрації наночастинок до 20 мкг/мл [13].

Miura N., Shinohara Y. [21] виявили токсичний вплив наночастинок срібла розміром порядку 5 нм на культуру клітин лінії HeLa S3.

Життєздатність клітин різко падала при концентрації наночастинок 120 мкг/мл. Токсичні ефекти, які виявлялись у апоптозі клітин, спостерігали при концентраціях 60 мкг/мл. Тим не менш, як зазначають автори, дані цифри є приблизно у 5,4 раза більшими у порівнянні із розчином нітрату срібла, що свідчить про нижчу токсичність наночастинок. Окрім цього, дослідниками виявлено індукцію наносріблом експресії генів, які відповідають за генерацію оксидативного стресу, що характерно для впливу важких металів. Отже, зазначають вони, механізм впливу наносрібла на клітину є дещо відмінним.

Samberg M. E., Oldenburg S. J., Monteiro-Riviere N. A [26] дослідили вплив НЧС різного розміру на культури клітин людських епідермальних кератиноцитів. Автори зробили припущення, що цитотоксичність наночастинок може бути пов'язана не лише з ними самими, а й з наявністю певних домішок (наприклад, формальдегіду) при їх виробництві.

Незважаючи на те, що ці дані ясно вказують на токсичність наночастинок срібла по відношенню до клітин ссавців у певних концентраціях, дослідження не повинні обмежуватись лише експериментами *in vitro*, адже серед експертів й досі

не існує однозначної думки щодо взаємозамінності дослідів *in vivo* та *in vitro* [3].

Дослідження токсичності *in vivo*. Не менш важливими є досліді на живих тваринах. При цьому визначають токсичний вплив як при одноразових (гостра токсичність), так і при повторних введеннях. Встановлено, що DL_{50} колоїдного срібла та срібла нітрату для мишей становить 100 та 125 мг/кг відповідно. Для порівняно менш розчинного оксиду срібла ця цифра становить 2820 мг/кг (щурі) [25]. Однак, ці цифри стосуються препаратів, які отримані традиційним способом без залучення нанотехнологій. При дослідженні гострої токсичності на щурах Sprague-Dawley гелю з наночастинками срібла встановлено, що DL_{50} при нанесенні на шкіру понад 2000 мг/кг. Для порівняння терапевтична концентрація наночастинок сферичної форми розміром 7 — 20 нм у гелі становила 0,02 та 0,1 мг/г. Дослідники роблять висновок про цілковиту безпечність застосування гелю [16].

Автори [17] вказують, що DL_{50} НЧС при прийомі внутрішньо складає 1266 мг/кг та 284 мг/кг при ін'єкційному шляху введення, а дози у $1,32 \cdot 10^6$ частинок/см³, 61 мкг/м³ є нешкідливими при вдиханні для щурів Sprague-Dawley. Ordzhonikidze G., Ramaïyua L.K., Egorova E.M [22] досліджували вплив розчину НЧС (розміри 9 ± 6 нм) із стабілізатором (аніоногенна поверхнево-активна речовина, ПАР) при їх внутрішньочеревинному введенні мишам лінії BALB/c. Встановлено, що DL_{50} для такого препарату становить $1,9 \cdot 10^{-6}$ мг/г ваги (1,9 мкг/кг). При цьому відзначено, що препарат був приблизно на 4 порядки токсичнішим ніж ПАР, що вводився окремо. Генотоксичний ефект автори оцінювали за пошкодженою ДНК клітин селезінки електрофоретичним методом. Виявлено, що пошкоджуюча дія по відношенню до ДНК більш виражена при ін'єкціях ПАР, ніж препарату. Відзначено також порушення розвитку сперматозоїдів, зокрема аномальна морфологія голівки сперматозоїдів. Дослідники пов'язують ці зміни хромосомними абераціями та мутаціями під впливом НЧС.

На сьогодні бракує досліджень щодо впливу НЧС при повторних

введеннях *in vivo*. В оглядовій статті [15] автори, посилаючись на дослідження Kim Y. S., Kim J. S., Cho H. S. et al (2008), які проводили 28-денний експеримент на щурах Sprague-Dawley. Обраний шлях введення НЧС (розмір 60 нм) — оральний, обрано три рівні доз: "низька" (30 мг/кг), "помірна" (300 мг/кг) та "висока" (1000 мг/кг). По завершенню експерименту автори відзначили наступні зміни. При введеннях дози НЧС понад 300 мг/кг може спостерігатись незначне ушкодження печінки, що виявлялось у суттєвих змінах показників активності лужної фосфатази та холестеролу. Відзначено, що накопичення НЧС у органах і тканинах не є дозозалежним. Викликає зацікавленість такий факт: дослідники спостерігають більше накопичення НЧС у нирках самиць у порівнянні із самцями щурів (більш ніж на два порядки), тобто мають місце статеві особливості кумуляції.

Привертають увагу дослідження впливу НЧС при інгаляційному шляху потрапляння по відношенню до щурів. Проведені 28-денний та субхронічний 90-денний експерименти [27]. Результати 28-денного експерименту з інгаляцією НЧС мало відрізнялись від попереднього згаданого досліді з оральним шляхом введення, навіть незважаючи на те, що в дослідження брали НЧС різних розмірів. Відзначено, що концентрація НЧС у повітрі на рівні $1,32 \cdot 10^6$ частинок/м³ (або 61 мкг/м³) не справляє помітних ефектів на здоров'я тварин. Заснований на попередніх дослідіах, 90-денний субхронічний експеримент, мав на меті встановити рівень дози, при якому не спостерігається небажаних ефектів, а також пороговий рівень впливу. Дослідниками обрано три рівні доз: "низька" ($0,6 \cdot 10^6$ частинок/м³, 49 мкг/м³), "помірна" ($1,4 \cdot 10^6$ частинок/м³, 133 мкг/м³), "висока" ($3,0 \cdot 10^6$ частинок/м³, 515 мкг/м³). Дані дози обирали із урахуванням ГДК (гранично допустимі концентрації) срібного пилу, встановленого АСГІН (Американська конференція державних та промислових спеціалістів у гігієні) на рівні 0,1 мг/м³. Обрані дози відповідали 1/2-, 1- та 5-кратній ГДК срібла у повітрі відповідно. Спостереження за поведінкою тварин, їх харчуванням, зважування та

біохімічні дослідження не виявили помітних дозозалежних відмінностей між груп тварин. При дослідженні розподілу у тканинах НЧС чітко встановлено дозозалежне збільшення концентрації срібла у крові та печінці у щурів обох статей. На відміну від попередніх експериментів виявлені більші концентрації срібла у нюхових цибулинах, ніж у мозку та дозозалежне збільшення цих концентрацій. Як і в 28-денному експерименті з оральним шляхом введення, дослідники відзначили статевозалежне накопичення НЧС у нирках: у щурів жіночої статі концентрація срібла у нирках була на 3 — 4 порядки вищою, аніж у самців. Разом з тим проведене авторами визначення функції нирок за допомогою N-ацетилглутамату не показало істотних відмінностей при порівнянні груп самиць та самців. Гістопатологічні дослідження виявили дозозалежну гіперплазію епітелію жовчних шляхів, яка у самиць спостерігалась частіше, ніж у самців. Також у самиць були наявні поодинокі гепатоцелюлярні некрози із підвищеною кількістю еозинофілів та конденсованими зжуженими ядрами. Гістопатологічне дослідження легень виявило мінімальні пошкодження з хронічними альвеолярними запаленнями, периваскулярним інфільтратом та накопиченням альвеолярних макрофагів. Ніяких патологічних змін у носових ходах не спостерігалось. Базуючись на результатах досліджень, автори визначили рівень дози, при якому не спостерігається небажаних ефектів 100 мкг/м³, що відповідає встановленій ГДК.

Певний інтерес представляє робота [24], у якій досліджували функціоналізовані наночастинами срібла пластикові катетери. Досліді *in vivo* проводились на самцях мишей лінії C57Bl/6J. Визначено, що НЧС у мишей виводяться головним чином з калом і динаміка їх виведення має дві фази, які характеризуються раптовим підйомом рівня екскреції у перші 3 — 4 доби та спадом протягом наступних 4 — 10 діб. Відмічено суттєву втрату у вазі мишей протягом експерименту.

Є відомості про вплив наночастинок срібла й на холоднокровних тварин, зокрема європейських окунів, у яких спостерігали прояви гіпоксії при концентраціях на-

носрібла 300 мкг/л у воді [14]. У роботі [19] описана зручна та економічно вигідна модель для досліджень екотоксикологічних аспектів виробництва наносрібла. Вивчали вплив наночастинок срібла на ембріони риби — товстоголового гольяну (*Pimephales promelas*). Автори вказують на відсутність кореляції між розмірами наночастинок та токсичним впливом. Для наночастинок срібла двох виробників відзначено схожі половинні летальні концентрації LC_{50} на рівні 9,4 та 10,6 мг/л у 96-годинному статичному дослідженні. Для порівняння LC_{50} срібла нітрату становила 15 мкг/л (майже у 1000 разів менше). При цьому показник LC_{50} суттєво знизився при перемішуванні води з наночастинами за допомогою ультразвуку. Відзначено патоморфологічні зміни у ембріонів гольяну при дії на них НЧС: відсутність повітряного мішка, розвиток помірних чи сильних набряків жовточного мішка та перикардіальної сумки, геморагії у головному відділі та перикардіальній ділянці, викривлення хребта (лордоз), краніофасціальні відхилення (маленькі голови).

Вплив наносрібла на організм людини. У статті [23] звертається увага на токсичний вплив нанорозмірного срібла на організм людини. Вказані основні шляхи потрапляння срібла до організму людини, зокрема інгаляційний, оральний, при контакті зі шкірою чи нанесенні

кремів зі сріблом. Особливий інтерес становлять дані щодо прийому внутрішньо препаратів срібла. Автори вказують, що при потрапленні до шлунково-кишкового тракту, близько 10 — 20% срібла всмоктується переважно дванадцятипалою та тонкою кишками. При нашкірному нанесенні обсяг абсорбованого срібла залежить від наявності на поверхні шкіри уражень. У організмі людини, за даними дослідників, срібло розподіляється нерівномірно, накопичуючись переважно у печінці, де срібло зв'язується з тіоловими групами біомолоекул, а також нирках та легенях. Хронічна дія срібла на організм призводить до відкладання його у шкірі та слизових оболонках, що супроводжується посиленням синтезом меланіну та появою характерного забарвлення покривів, так званої аргрії. Автори роблять припущення, що аргрія може бути захисним механізмом, спрямованим на уникнення накопичення небезпечних комплексів срібло-протеїн, чи сульфідів у тканинах. Встановлено, що срібло здатне зменшувати проникність клітин по відношенню спочатку до іонів K^+ , а потім й Na^+ . Відзначають негативний вплив наночастинок на чоловічу репродуктивну систему: вони здатні проникати через гематотестикулярний бар'єр, накопичуватись там та спричиняти негативні ефекти на сперматозоїди. Срібло може також накопичуватись у нервовій тканині ЦНС,

викликаючи тяжкі нервові розлади.

Виводиться срібло переважно з калом, для мишей та шурів цей показник становить 98 — 99%, для мавп — 94%, собак — 90% [25].

З вищезазначеного можна зробити висновок, що токсична дія наносрібла *in vitro* та *in vivo* має певні відмінності, перш за все слід відзначити те, що у дослідях *in vitro* токсичний ефект проявляється при помітно менших дозах НЧС. Цікава думка висловлена у роботі [20], де пояснюються значні відмінності у токсичності нанопрепаратів срібла при дослідженні *in vivo* та *in vitro*. Автори це пояснюють тим, що срібло швидко інактивується під дією фізіологічних концентрацій хлоридів та білків раневої поверхні. Також слід зауважити, що токсичність НЧС не може бути спричинена лише їх іонізацією з утворенням іонів Ag^+ [18].

Таким чином, токсикологічний аспект медичного застосування срібла є недостатньо вивченим, залишаючи досліднику більше питань, ніж відповідей. Суперечливою та маловивченою є проблема залежності токсичності від форми та розмірів наночастинок, бракує досліджень із впливу наночастинок на організм людини та тварин. Саме тому дані питання є ключовими у контексті безпечності новостворених препаратів наносрібла.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вильямс Л. Нанотехнологии без тайн / Л. Вильямс, У. Адамас; [пер. с англ.] — М.: Эксмо, 2010. — 368 с.
2. Нанохімія. Наносистеми. Наноматеріали. / [С.В. Волков, С.П. Ковальчук, В.М. Генко, О.В. Решетняк] — Київ, Наукова думка. — 2008. — 422 с.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів / [гол. ред. О.В. Стефанов] — К.: Авіценна, 2001. — С. 59.
4. Мовчан Б.А. Электронно-лучевая нанотехнология и новые материалы в медицине — первые шаги / Б.А. Мовчан // Вісник фармакології і фармації. — 2007. — №12. — 5-13.
5. Мовчан Б.А. Электронно-лучевая гибридная нанотехнология осаждения неорганических материалов в вакууме / Б.А. Мовчан // Актуальные проблемы современного материалообразования. — Киев: Изд. Академперіодика, 2008. — Т. 1. — С. 227-247.
6. Москаленко В.Ф. Нанонаука: стан, перспективи досліджень / В.Ф. Москаленко, Л.Г. Розенфельд, І.С. Чекман, Б.О. Мовчан // Науковий вісник Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. — 2008. — №4. — С. 19-25.
7. Патон Б. Нанонаука і нанотехнології: технічний, медичний та соціальний аспекти / Б. Патон, В. Москаленко, І. Чекман, Б. Мовчан // Вісн. НАН України. — 2009. — №6. — С. 18-26.
8. Рибачук А.В. Протимікробні властивості наносрібла / А.В. Рибачук, І.С. Чекман // Український науково-медичний журнал. — 2009. — №2. — С. 32-36.
9. Наносеребро: технология получения, фармакологические свойства, показания к применению / И.С. Чекман, Б.А. Мовчан, М.И. Загородный [та ін.] // Мистецтво лікування. — 2008. — №5 (51). — С. 32-34.
10. Чекман І.С. Нанонаука: перспективи наукових досліджень / І.С. Чекман // Наука та інновації. — 2009. — Т.5, №3. — С. 89-93.
11. Чекман І.С. Нанотехнології у роботі систем доставки лікарських засобів / І.С. Чекман, А.О. Прискока // Укр. Мед. Часопис. — 2010. — №1 (75). — С. 14-18.
12. Чекман І.С. Нанозолото та нанопокриття із золота: стан наукових досліджень, перспективи застосування у медицині / І.С. Чекман, А.О. Прискока // Укр. Мед. Часопис. — 2010. — №2 (75). — С. 37-43.
13. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts / S. Arora, J. Jain, J.M. Rajwade [et al.] // Toxicology and applied pharmacology. — 2009. — Vol. 236. — P. 310-318
14. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) / K. Bilberg, H. Malte, T. Wang [et al.] // Aquatic tox-

- icology. — 2010. — Vol. 96. — P. 159-165.
15. Hussain S. M. Safety evaluation of silver nanoparticles: inhalation model for chronic exposure / S.M. Hussain, J.J. Schlager // *Toxicological sciences*. — 2009. — Vol. 108. — № 2. — P. 223-224.
 16. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use / J. Jain, S. Arora, J.M. Rajwade [et al.] // *Mol. Pharm.* — 2009. — Vol. 6. — №5. — P. 1388-1401.
 17. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats / J.H. Ji, J.H. Jung, S.S. Kim [et al.] // *Inhal. Toxicol.* — 2007 — Vol. 19. — № 10. — P. — 857-871.
 18. Kavata K. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells / K. Kavata, M. Osawa, S. Okabe // *Environ. Sci. Technol.* — 2009. — Vol. 43. — № 15. — P. 6046-6051.
 19. Laban G. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos / G. Laban, L.F. Nies, R.F. Turco [et al.] // *Ecotoxicology*. — 2010. — Vol. 19. — P. 185-195.
 20. Madhumanthi K. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications / K. Madhumanthi, P.T. Sudsheesh Kumar, S. Abhilash [et al.] // *J. Mater. Sci: Mater. Med.* — 2010. — Vol 21. — № 2. — P. 807-813.
 21. Miura N. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells / N. Miura, Y. Shinohara // *Biochemical and Biophysical Communications*. — 2009. — Vol. 309. — P. 733-737.
 22. Ordzhonikidze G. Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice in vivo / G. Ordzhonikidze, L.K. Ramaiyya, E.M. Egorova // *Acta naturae*. — October-December. — Режим доступа до журн.: <http://actanaturae.ru/article.aspx?id=168>
 23. Panyala N. R. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to environment and human health? / N.R. Panyala, E.M. Pena-Mendez, J. Havel // *J. Appl. Biomed.* — 2008. — Vol. 6. — P. 117-119.
 24. Roe D. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles / D. Roe, B. Karandikar, Nathan Bonn-Savage [et al.] // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. — 2008. — Vol. 61. — P. 869-876.
 25. Rosmarine A. Toxicity summary for silver. / Rosmarine A. — Oak Ridge, Tennessee, 1992. — P. 2.
 26. Samberg M. E. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro / M.E. Samberg, S.J. Oldenburg, N.A. Monteiro-Riviere // *Environmental health perspectives*. Vol. 118. — № 3. — P. 407-413.
 27. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles / J.H. Sung, J.H. Ji, J.D. Park [et al.] // *Toxicological sciences*. — 2009. — Vol. 108. — № 2. — P. 452-461.

Надійшла до редакції 27.10.2010 р.