

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Василькевич В.М.¹, Богданов Р.В.¹, Гилевская К.С.², Куликовская В.И.²

Изучение токсичности и особенностей биологического действия нанокompозита пектин-Ag: результаты субхронического эксперимента

¹Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 220012, г. Минск, Республика Беларусь²ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси», 220141, г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Нанокompозиты, синтезированные методом «зелёной химии», не содержат в своем составе в качестве носителей и/или стабилизирующих оболочек токсичных химических веществ (восстановителей и органических растворителей). Одними из представителей данной группы материалов являются нанокompозиты на основе серебра, всё более широко используемые в медицинской практике, ветеринарии и в некоторых других областях.

Материал и методы. Нанокompозит представляет собой наночастицы Ag⁰, покрытые оболочкой высокометоксилированного пектина. Концентрация наночастиц Ag⁰ в гидрозоле нанокompозита пектин-Ag составляет 1,65 ммоль/л, а содержание пектина – 7,5 мг/мл. Размер синтезированного нанокompозита пектин-Ag ~ 20–30 нм, более 90% частиц имеют диаметр менее 20 нм, величина ξ -потенциала составляет $45,3 \pm 0,7$ мВ. Токсикологические исследования проведены на аутбредных крысах. Основной целью исследований являлось изучение токсических эффектов нанокompозита пектин-Ag в субхроническом эксперименте (90 сут). По окончании эксперимента определяли комплекс поведенческих и клинико-лабораторных показателей, позволяющих оценить биологическое действие нанокompозита на животных. Результаты исследований подвергались статистической обработке.

Результаты. При субхроническом внутрижелудочном введении лабораторным животным (крысы) нанокompозита пектин-Ag на протяжении 3 мес в дозах 50, 500 и 5000 мг/кг было установлено, что нанокompозит проявляет дозозависимое общетоксическое действие с критическими органами-мишенями – печень и селезёнка и основными биохимическими маркерами токсического эффекта – аминотрансферазы, щелочная фосфатаза и лактатдегидрогеназа.

Заключение. Проведённые экспериментальные исследования позволили обосновать пороговые дозы гидрозоля нанокompозита пектин-Ag при внутрижелудочном пути поступления.

Ключевые слова: наночастицы серебра; пектин; «зеленая» химия; токсичность; безопасные уровни воздействия

Для цитирования: Василькевич В.М., Богданов Р.В., Гилевская К.С., Куликовская В.И. Изучение токсичности и особенностей биологического действия нанокompозита пектин-Ag: результаты субхронического эксперимента. *Токсикологический вестник*. 2021; 29(5): 25-33. DOI: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-5-25-33>

Для корреспонденции: Василькевич Вадим Михайлович, кандидат мед. наук, старший научный сотрудник республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены», Республика Беларусь, 220012, г. Минск. E-mail: sabas2004@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках задания 04.02 ОНТП «Гигиеническая безопасность» (№ГР 20191607) и частично гранта Х19ИНДГ-002 «Разработка биосовместимых покрытий с антибактериальными свойствами для полипропиленовых хирургических сеток с целью улучшения их функциональности».

Участие авторов. Василькевич В.М. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистический анализ, написание текста, редактирование; Богданов Р.В., Гилевская К.С., Куликовская В.И. – написание текста, редактирование. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Поступила в редакцию 27 августа 2021 / Принята в печать 20 сентября 2021 / Опубликовано 30 октября 2021

Vasilkevich V.M.¹, Bogdanov R.V.¹, Gilevskaya K.S.², Kulikovskaya V.I.²

Study of toxicity and peculiarities of biological effects of nanocomposite pectin-Ag: results of a subchronic experiment

¹Republican unitary enterprise «Scientific Practical Centre of Hygiene», Ministry of Health of the Republic of Belarus, 220012, Minsk, Republic of Belarus;

²State Scientific Institution “Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus”, 220141, Minsk, Republic of Belarus

Introduction. Nanocomposites synthesized by the “green chemistry” method do not contain toxic chemicals (reducing agents and organic solvents) as carriers and/or stabilizing shells. One of the representatives of this group of materials are nanocomposites based on silver, which are increasingly used in medical practice, veterinary medicine, and in some other fields.

Material and methods. The nanocomposite is Ag⁰ nanoparticles coated with a highly methoxylated pectin shell. The concentration of Ag⁰ nanoparticles in the hydrosol of the pectin-Ag nanocomposite is 1.65 mmol/l, and the pectin content is 7.5 mg/ml. The size of the synthesized pectin-Ag nanocomposite is ~20–30 nm, more than 90% of the particles have a diameter of less than 20 nm, the value of the ξ -potential is 45.3 ± 0.7 mV. Toxicological studies were carried out on outbred rats. The main goal of the research was to study the toxic effects of the pectin-Ag nanocomposite in a subchronic experiment (90 days). At the end of the experiment, a complex of behavioral and clinical and laboratory parameters was determined, which made it possible to assess the biological effect of the nanocomposite on animals. The research results were statistically processed.

Results. With subchronic intragastric administration of the pectin-Ag nanocomposite to laboratory animals (rats) for 3 months at doses of 50, 500, and 5000 mg/kg, it was found that the nanocomposite exhibits a dose-dependent general toxic effect with critical target organs - the liver and spleen and the main biochemical markers of toxicity effect - aminotransferase, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase.

Conclusion. Experimental studies have made it possible to substantiate the threshold doses of the hydrosol of the pectin-Ag nanocomposite for the intragastric route of intake.

Keywords: *silver nanoparticles; pectin; green chemistry; toxicity; safe exposure levels*

For citation: Vasilkevich V.M., Bogdanov R.V., Gilevskaya K.S., Kulikovskaya V.I. Study of toxicity and peculiarities of biological effects of nanocomposite pectin-Ag: results of a subchronic experiment. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2021; 29(5): 25-33. DOI: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-5-25-33> (In Russian)

For correspondence: Vadim M. Vasilkevich, Ph.D. in Medicine, Senior Research Scientist of Republican unitary enterprise «Scientific Practical Centre of Hygiene», Ministry of Health of the Republic of Belarus, 220012, Minsk, Republic of Belarus. E-mail: sabas2004@mail.ru

Information about the authors:

Vasilkevich V.M., <https://orcid.org/0000-0002-6461-0655>

Bogdanov R.V., <https://orcid.org/0000-0003-3655-4155>

Gilevskaya K.S., <https://orcid.org/0000-0002-3121-0014>

Kulikovskaya V.I., <https://orcid.org/0000-0001-6505-3929>

Conflict of interests. The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the task 04.02 of the National Engineering Design Standards “Hygienic safety” (№ GR 20191607) and partially the grant Kh19INDG-002 “Development of biocompatible coatings with antibacterial properties for polypropylene surgical meshes in order to improve their functionality.”

Author contribution: Vasilkevich V.M. – concept and design of the study, collection and processing of material, statistical analysis, text writing, editing; Bogdanov R.V., Gilevskaya K.S., Kulikovskaya V.I. – text writing, editing. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Received: August 27, 2021 / Accepted: , 2021 / Published: September 30, 2021

Введение

В настоящее время из-за чрезмерного использования антибиотиков в медицине и животноводстве тенденция появления микроорганизмов, устойчивых к используемым антибактериальным препаратам, принимает все более распространённый характер. Несмотря на это, антибиотикотерапия в настоящее время остаётся главным инструментом при лечении бактериальных инфекций. В связи с этим в последние годы возвращается интерес к наночастицам серебра как перспективным бактерицидным агентам, поскольку они действуют на различные белковые объекты в клетке, и микроорганизмы не способны вырабатывать к ним резистентность [1]. Для снижения нежелательного токсического действия наночастиц серебра на клетки организма его поверхность модифицируют полимерами [2, 3].

В настоящее время перспективным направлением является разработка подходов к синтезу наночастиц серебра в соответствии с принципами «зелёной» химии, то есть без использования токсичных восстановителей и органических растворителей. В качестве восстановителей катионов серебра могут применяться экстракты растений и грибов, а также полисахариды [4]. При использовании полисахаридов (пектин, альгинат, хитозан и др.) для синтеза наночастиц Ag получаемые бионаноконпозиты могут обладать свойствами, присущими каждому из компонентов, в том числе возможна реализация синергетического действия. Например, при синтезе наночастиц серебра путем восстановления катионов Ag^+ пектином можно получить наноконпозиты, обладающие антибактериальными свойствами (за счет присутствия наночастиц Ag) и высокой адгезией к некоторым биологическим тканям организма животных и человека (за счет наличия оболочки пектина). Наличие антимикробных свойств у наноконпозитов полимер-Ag позволяет использовать их в различных сферах: медицине, сельском хозяйстве, фармации и пищевой промышленности. Так, наноконпозиты из серебра и полисахаридов находят применение при создании антимикробных покрытий для медицинских изделий (стендов, имплантов, ранозаживляющих повязок и др.), при разработке новых высокоэффективных антибактериальных препаратов против резистентных штаммов микроорганизмов и в других областях [5–8]. Перспективы широкого внедрения наноконпозитов на основе серебра

в медицинской практике, ветеринарии и других областях определяют актуальность одновременного изучения их биологического действия, оценки токсичности и опасности, определения риска для здоровья человека.

Материал и методы

Наноконпозит представляет собой наночастицы Ag^0 , покрытые оболочкой высокометоксилированного пектина (степень этерификации 80,4%, средневязкостная молекулярная масса $141 \cdot 10^3$ г/моль). Гидрозоли наночастиц серебра, стабилизированных оболочкой пектина (наноконпозит пектин-Ag), были синтезированы в соответствии с принципами «зелёной» химии путем химического восстановления $AgNO_3$ в водных средах под действием природного полисахарида пектина по ранее разработанной методике [9, 10].

Размер частиц наноконпозита пектин-Ag определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на микроскопе JEOL-LEM-1400 (Jeol Ltd., Япония), а величину ξ -потенциала их поверхности измеряли на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Исследование субхронической токсичности позволяет получить информацию о токсичности и кумулятивной способности, определить органы-мишени при дозозонной экспозиции.

Выбор доз для исследования. Первоначально были проведены острый и подострый эксперименты с наноконпозитом пектин-Ag, в которых была изучена их острая и подострая токсичность с целью последующего подбора доз наноконпозита для постановки длительных экспериментов. Ранее было установлено, что гидрозоль наноконпозита пектин-Ag при однократном внутрижелудочном введении в организм белых крыс и мышей в дозах от 5000 до 25000 мг/кг не вызывал их гибели [11]. Также в условиях подострого эксперимента (28 дней) наноконпозит пектин-Ag при внутрижелудочном введении в дозе 1000 мг/кг/день не приводил к смерти животных, но всё же оказывал общетоксическое действие с преимущественным нарушением антиоксидантной системы (система глутатиона) и иммунологической реактивности (активация фагоцитарной и метаболической активности гранулоцитарно-макрофагальных клеток крови) организма подопытных животных [12].

Таким образом, на раннем этапе формирования ответной реакции на повторное, но относительно непродолжительное (~1 мес) токсическое воздействие нанокompозита на организм лабораторных животных наблюдалась активация основных регуляторных систем организма, обеспечивающих гомеостаз. С учётом данных результатов, для постановки субхронического эксперимента выбраны следующие дозы гидрозоль нанокompозита пектин-Аг: 50, 500 и 5000 мг/кг/день (1-я, 2-я и 3-я группы соответственно), которые вводили внутривентрикулярно на протяжении 3 мес.

Исследования проведены на белых нелинейных крысах. Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки с учетом пола и массы тела в качестве определяющего показателя, при этом разность в массе тела животных составляла не более 10%. Группе контрольных животных вводили раствор пектина, концентрация которого была эквивалентной максимальной дозе нанокompозита.

Условия содержания животных соответствовали требованиям санитарных правил и норм 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утверждённых постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 31 октября 2006 г. № 131. Проведение экспериментов и выведение лабораторных животных из опыта соответствовали принципам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в эксперименте (Хельсинки, 1986 г.).

Функциональное состояние нервной системы лабораторных животных оценивали по способности суммировать подпороговые импульсы (СПП). Для дополнительной оценки уровня ориентировочно-исследовательской и эмоционально-поведенческой активности центральной нервной системы использовали тест «открытое поле», в котором регистрировали такие показатели, как количество вертикальных стоек, количество актов обследования отверстий (норок) в полу – установки для теста «открытое поле» («норковый» рефлекс), количество эпизодов груминга (умываний), количество эпизодов фризинга (замираний), горизонтальную активность. Эксперименты проводили на установке «Открытое поле» (производства ООО «НПК Открытая Наука», Россия) с диаметром арены 97 см и высотой стенок 42 см.

Гематологические показатели периферической крови (гемоглобин, эритроциты, лейкоциты, лейкоцитарная формула, тромбоциты, цветной показатель) животных определяли на гематологическом анализаторе «Mindray 5300-Vet».

Для оценки биологического действия гидрозоль нанокompозита пектин-Аг применяли интегральные и биохимические показатели, характеризующие функциональное состояние органов и систем организма. В качестве основных биохимических маркеров состояния организма лабораторных животных использовали совокупность клинико-лабораторных биохимических показателей («clinical biochemical tests») для оценки токсичности химических соединений, рекомендуемых методическими документами Руководства ОЭСР (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects) [13]. Биохимические показатели сыворотки крови (белок общий, глюкоза, креатинин, лактатдегидрогеназа (ЛДГ), щелочная фосфатаза (ЩФ), мочевины, аспаратаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), железо, магний, кальций, триглицериды, мочевины, мочевины кислота, билирубин) определяли на автоматическом биохимическом анализаторе Accent 200 (Польша) и BIOSYSTEMS (Испания).

Показатели функции почек (диурез, рН, белок, глюкоза, билирубин, лейкоциты) определяли на автоматическом анализаторе мочи LABUMAT 2 (Венгрия).

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена непараметрическими методами с помощью компьютерной программы Statistica 13 (лицензия № AXA8111525627ARCN2ACD-M). Различия в сравниваемых группах считались статистически значимыми при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ (по критерию Манна–Уитни).

Результаты и обсуждение

В качестве объекта исследования был выбран синтезированный с помощью подходов «зелёной» химии гидрозоль наночастиц Аг, покрытый оболочкой биосовместимого и нетоксичного биополимера (пектина). Такие нанокompозиты пектин-Аг обладают высоким потенциалом применения в биомедицинских целях, так как в предыдущих исследованиях было показано, что они проявляют выраженную антибактериальную активность как в отношении грамположительных, так и

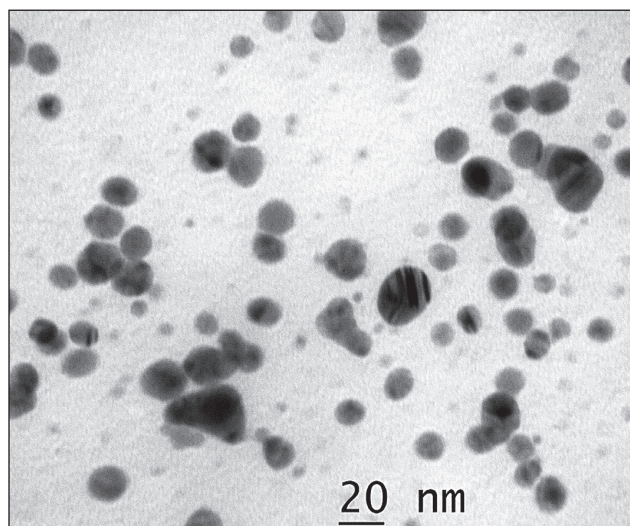
грамотрицательных бактерий [9]. В связи с этим актуальным является оценка токсичности и биологического действия нанокompозита пектин-Ag в субхроническом эксперименте.

Предполагается, что наличие биополимерной оболочки на поверхности наночастиц Ag в полученных нанокompозитах должно обеспечивать не только их агрегационную стабильность, но и низкую токсичность.

Согласно данным атомно-адсорбционной спектроскопии, выход реакции восстановления катионов Ag^+ в водных средах пектином равен 97%, при этом концентрация наночастиц Ag в синтезированном гидрозоле нанокompозита пектин-Ag составляет 1,65 ммоль/л, а содержание пектина – 7,5 мг/мл. Размер синтезированного нанокompозита пектин-Ag составляет ~20–30 нм, при этом более 90% частиц имеют диаметр менее 20 нм. Согласно результатам просвечивающей электронной микроскопии, частицы полученного нанокompозита пектин-Ag имеют сферическую форму (см. рисунок).

Необходимо отметить, что при сравнительном анализе результатов подострого токсикологического эксперимента наночастиц серебра украинскими учёными была установлена меньшая токсичность для серебряных наносфер, в отличие от наночастиц серебра с более сложными геометрическими формами (например, декаэдрических форм) [14], что является благоприятным прогностическим физико-химическим критерием, влияющим на токсичность нанокompозита в контексте его практического применения.

ζ -потенциал – один из важных параметров, характеризующих стабильность коллоидной системы. Коллоиды с высоким ζ -потенциалом (≥ 30 мВ по модулю) являются электрически стабилизированными. Величина ξ -потенциала синтезированных частиц нанокompозита пектин-Ag составляет $45,3 \pm 0,7$ мВ и свидетельствует об их высокой агрегативной устойчивости. Следовательно, синтезированные образцы, представляющие собой наночастицы Ag, стабилизированные оболочкой отрицательно заряженного полисахарида пектина, должны являться агрегативно-стабильными и сохранять свои физико-химические характеристики во времени. Установлено, что при хранении гидрозолей пектин-Ag в течение 6 мес при комнатной температуре, в темноте седиментации нано-



Изображение частиц нанокompозита пектин-Ag. Просвечивающая электронная микроскопия, ув. $\times 100\,000$.

Image of the particles of the pectin-Ag nanocomposite. Transmission electron microscopy, magnification $\times 100\,000$.

частиц, образования агрегатов или осадка не происходит. При этом ξ -потенциал частиц через 6 мес после синтеза практически не меняется и составляет $47,7 \pm 3,2$ мВ, а доля регистрируемых в растворе свободных катионов Ag через 6 мес хранения составила менее 6%. Подробные физико-химические характеристики, а также особенности синтеза нанокompозита пектин-Ag приведены в предыдущих публикациях авторов [9, 10].

На протяжении всего эксперимента гибель животных в опытных и контрольной группах не зарегистрирована.

Результаты, полученные в конце эксперимента после их статистической обработки (морфо-функциональные, биохимические, гематологические показатели крови и показатели мочи) приведены в таблице.

Анализ статистически значимых показателей, которые изменились в ответ на дозозависимое токсическое воздействие гидрозоля нанокompозита пектин-Ag свидетельствует о том, что из всех испытанных доз в качестве недействующей можно принять дозу 50 мг/кг (1-я группа), на уровне которой наблюдались лишь минимальные отклонения при сравнении с интактным контролем в виде снижения нейтрофилов (на 38%) на фоне лимфоцитоза (на 10%), при этом остальные анализируемые клинико-диагностические показатели не отличались при сравнении с контрольной группой с вероятностью статистической ошибки 0,05. Учитывая, что показатели периферической

Морфо-функциональные и биохимические показатели состояния лабораторных животных (n = 10) по окончании эксперимента, Me (XQ₁-XQ₃)

Morpho-functional and biochemical indicators of the state of laboratory animals (n = 10) at the end of the experiment, Me (XQ₁-XQ₃)

Показатель	Группа			
	контрольная	1-я (50 мг/кг)	2-я (500 мг/кг)	3-я (5000 мг/кг)
Функциональные показатели ЦНС				
Суммационно-пороговый потенциал, Вольт	1,60 (1,45–1,85)	1,75 (1,65–1,80)	1,85 (1,65–2,05)	1,70 (1,50–2,20)
Количество вертикальных стоек, усл. ед.	3,00 (2,00–9,00)	7,00 (5,00–8,00)	6,00 (4,00–10,00)	11,00* (2,50–13,50)
«Норковый» рефлекс, усл. ед.	2,00 (0,00–3,00)	3,00 (2,00–4,00)	3,00 (1,00–4,00)	4,00 (3,00–7,50)
Количество эпизодов фризинга, усл. ед.	4,00 (2,00–5,00)	2,00 (1,00–2,00)	3,00 (2,00–4,00)	3,00 (1,50–5,00)
Количество случаев груминга, усл. ед.	2,00 (1,00–4,00)	6,00 (5,00–8,00)	9,00* (6,00–10,00)	8,50* (5,50–11,00)
Горизонтальная активность, усл. ед.	20,0 (16,00–29,00)	26,0 (15,00–34,00)	23,00 (10,0–25,0)	19,00 (12,00–36,50)
Масса тела и внутренних органов, кг⁻³				
Масса тела (в конце эксперимента)	282,0 (255,0–266,0)	228,0 (226,0–270,0)	270,0 (252,0–292,0)	268,0 (251,0–294,0)
Масса печени	10,72 (9,42–12,12)	7,85 (6,80–8,82)	9,35 (7,27–9,97)	8,77 (7,95–9,72)
Масса почек	1,90 (1,80–2,10)	1,72 (1,57–2,02)	1,97 (1,67–2,15)	2,02 (1,85–2,20)
Масса селезёнки	0,95 (0,87–1,17)	1,20 (1,02–1,27)	1,97 (1,67–2,15)*	2,02 (1,85–2,20)*
Масса сердца	0,95 (0,92–0,95)	0,87 (0,82–0,97)	1,02 (0,90–1,10)	0,97 (0,90–1,00)
Масса лёгких	2,15 (1,85–2,85)	1,77 (1,75–1,80)	2,25 (2,17–2,77)	1,87 (1,70–2,05)
Относительные коэффициенты массы внутренних органов, кг⁻³/кг				
Печень	3,73 (3,44–4,23)	3,19 (3,08–3,27)	3,39 (3,09–3,51)	3,72 (3,08–3,55)
Почки	0,69 (0,66–7,26)	0,72 (0,68–0,75)	0,74 (0,79–0,79)	0,76 (0,69–0,79)
Селезёнка	0,34 (0,30–0,43)	0,45 (0,40–0,52)	0,74 (0,79–0,78)*	0,73 (0,67–0,79)*
Сердце	0,31 (0,32–0,38)	0,36 (0,34–0,33)	0,32 (0,36–0,46)	0,34 (0,36–0,34)
Лёгкие	0,84 (0,69–1,24)	0,74 (0,65–0,96)	0,96 (0,92–1,72)	0,66 (0,62–0,74)
Гематологические показатели периферической крови				
Эритроциты, 10 ¹² /л	7,94 (7,78–8,17)	7,65 (7,34–8,10)	8,32 (7,73–8,54)	8,24 (7,81–8,41)
Гемоглобин, г/л	147,0 (145,5–147,5)	141,0 (134,0–149,0)	156,0 (147,0–162,0)	151,0 (150,0–158,5)**
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	17,52 (14,05–22,00)	16,27 (15,09–22,62)	20,64 (11,72–24,39)	14,59 (13,77–15,45)
Тромбоциты 10 ⁹ /л	838,5 (753,0–1017,5)	997,0 (937,0–1130,0)	917,0 (706,0–1104,0)	1017,5 (969,0–1062,0)
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	4,08 (3,72–4,60)	3,21 (2,62–4,16)	3,81 (2,04–4,85)	2,98 (2,70–3,85)
Относительное содержание нейтрофилов, %	24,2 (21,1–30,5)	17,5 (14,0–21,2)*	19,1 (16,2–23,5)	21,2 (15,3–26,0)
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	11,99 (8,72–14,40)	11,56 (10,06–17,28)	14,08 (8,44–16,00)	10,03 (9,51–10,99)
Относительное содержание лимфоцитов, %	67,0 (59,0–70,0)	74,0* (69,0–76,0)	69,3 (65,5–74,4)	70,6 (65,1–73,3)
Моноциты, 10 ⁹ /л	0,67 (0,46–0,79)	0,59 (0,36–0,82)	0,71 (0,50–0,88)	0,52 (0,42–0,59)
Относительное содержание моноцитов, %	4,0 (3,0–5,0)	3,0 (2,0–4,0)	3,0 (2,0–5,0)	3,0 (2,0–4,0)
Эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,85 (0,72–1,06)	0,70 (0,56–0,86)	0,75 (0,45–1,53)	0,73 (0,66–0,81)
Относительное содержание эозинофилов, %	4,0 (3,0–6,0)	4,0 (2,0–5,0)	4,0 (3,0–6,0)	5,0 (4,0–5,0)
Базофилы, 10 ⁹ /л	0,19 (0,06–0,28)	0,10 (0,04–0,20)	0,19 (0,06–0,34)	0,10 (0,05–0,13)
Относительное содержание базофилов, %	0,50 (0,00–1,00)	0,00 (0,00–0,00)	0,00 (0,00–0,00)	0,00 (0,00–0,00)

Окончание таблицы на стр. 31

Окончание таблицы. Начало на стр. 30

Показатель	Группа			
	контрольная	1-я (50 мг/кг)	2-я (500 мг/кг)	3-я (5000 мг/кг)
Биохимические показатели крови				
Глюкоза, мкмоль/л	11,24 (9,55–13,11)	8,67 (7,17–10,14)	8,31 (6,13–9,18)*	9,51 (8,05–10,51)
Креатинин, мкмоль/л	45,89 (43,92–48,17)	51,73 (45,29–52,72)	51,25 (45,84–51,44)	47,29 (43,41–50,67)
Лактатдегидрогеназа, Ед/л	1524,3 (1307,6–2226,6)	2041,7 (1738,7–2116,2)	1967,4 (1733,2–2850,6)	2622,6 (1880,5–3532,8)
Общий белок в сыворотке крови, г/л	88,00 (73,25–105,6)	93,65 (76,20–102,9)	70,10 (34,60–76,20)	87,10 (60,90–101,65)
Мочевина, ммоль/л	23,44 (22,76–24,26)	23,16 (21,47–24,96)	21,80 (20,84–22,87)**	22,62 (21,68–23,53)
Щелочная фосфатаза, Е/л	213,4 (115,8–301,3)	134,4 (50,20–372,0)	126,2 (100,0–179,8)	106,9 (75,95–153,1)**
Аланинаминотрансфераза сыворотки крови, Ед/л	139,0 (133,8–167,3)	139,8 (113,9–164,7)	118,5 (93,50–131,2)*	101,8 (99,00–110,9)**
Аспаратаминотрансфераза сыворотки крови, Ед/л	162,5 (142,4–179,7)	181,4 (162,8–204,1)	165,3 (148,7–194,2)	167,85 (150,7–195,2)
Показатели функционального состояния почек				
Диурез, л ⁻³ /сут	4,00 (3,75–4,25)	4,20 (4,00–4,35)	4,40 (3,73–5,75)	4,05 (3,80–4,20)
pH мочи	6,75 (6,53–6,97)	6,29 (6,11–6,47)	7,25 (7,00–7,50)	6,50 (6,00–7,00)
Белок, г/л	0,1 (0,1–0,3)	0,1 (0,1–0,2)	0,11 (0,09–0,15)	0,15 (0,09–0,20)
Лейкоциты, в 1 мкл	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
Билирубин, мг/100 мл	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
Глюкоза, мг/дл	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)

Примечание. Статистически значимые различия с контролем по критерию U: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$.

крови являются лабильными, а лимфоцитоз не проявился при более массивном дозовом воздействии (2-я и 3-я группы), дозу в 50 мг/кг для нанокompозита пектин-Аg при внутрижелудочном пути поступления можно расценивать как близкую к максимальной недействующей (NOAEL).

Также необходимо отметить, что более высокие дозы нанокompозита (на один и два порядка соответственно) привели к более выраженным изменениям биохимических показателей крови (отклонения содержания ЛДГ, глюкозы, мочевины, щелочной фосфатазы, активность АЛТ). Для группы с наиболее высоким уровнем экспозиции нанокompозита пектин-Аg (3-я группа) также отмечены изменения показателей периферической крови (содержание гемоглобина и нейтрофилов), наблюдалась активизация (в 3,66 раза, $p < 0,05$) вертикальной двигательной активности и увеличение (в 4,25 раза, $p < 0,05$) эпизодов груминга, что может свидетельствовать о нарушении исследовательского поведения и повышенной тревожности животных.

Большинство перечисленных выше показателей изменились в сторону уменьшения/

снижения от уровня контрольной группы. В этом контексте особый интерес вызывают изменения содержания (следовательно, активности) в сыворотке крови маркеров повреждения клеток печени – АЛТ и ЩФ (уменьшение в 3-й группе – 5000 мг/кг – в 1,36 и 5,2 раза соответственно, при уровне статистической значимости $p < 0,01$). Необходимо отметить, что снижение сывороточной активности АЛТ в литературе рассматривается как не имеющий клинической аналогии признак функциональной депрессии клеток печени, который в клинико-лабораторной практике может быть использован как ранний диагностический критерий цитотоксического эффекта в отношении гепатоцитов. В подтверждение данного наблюдения, Л.В. Хрипач и соавт. (2013) [15], основываясь на анализе данных литературы и результатах собственных исследований, пришли к выводу, что «снижение активности АЛТ является транзиторным состоянием, за которым следует увеличение активности АЛТ, которое вызвано токсическим повреждением мембран гепатоцитов и выходом фермента в кровь».

Таким образом, оценка клинико-лабораторных и функциональных изменений при экспозиции нанокompозита в дозах 500 и 5000 мг/кг позволила установить минимальную действующую (пороговая или LOAEL) дозу в данном эксперименте, которая составляет 500 мг/кг.

Из интегральных показателей, которые в токсикологическом эксперименте используют для оценки состояния и определения критических внутренних органов, обращает на себя внимание изменение массы и массового коэффициента селезенки, которая известна как орган, выполняющий иммунную и лимфопоэтическую функции. Увеличение абсолютной и относительной массы селезенки в субхроническом эксперименте при дозе 500 мг/кг прежде всего можно связать с нарушением иммунного гомеостаза, который был отмечен нами ранее в подостром эксперименте с внутрижелудочным введением нанокompозита пектин-Ag (доза 1000 мг/кг/день) по ряду показателей иммунотоксического эффекта [12]. Это предположение можно также обосновать функциональной ролью органа, в котором образуются «иммунные» клетки крови — лимфоциты и моноциты.

О дозовой зависимости в развитии токсических эффектов в ответ на внутрижелудочное поступление в организм крыс гидрозоля нанокompозита пектин-Ag свидетельствует количество значимо изменившихся показателей в подопытных группах — оно возрастает с увеличением дозы (50 мг/кг — 2; 500 мг/кг — 5; 5000 мг/кг — 8), выраженность изменений (при дозе 5000 мг/кг три показателя имеют уровень значимости $p < 0,01$).

Выводы

1. Для нанокompозита пектин-Ag при внутрижелудочном субхроническом введении лабораторным животным характерно дозозависимое общетоксическое действие с критическими органами-мишенями печень и селезенка и основными биохимическими маркерами токсического эффекта — аминотрансферазы, щелочная фосфатаза и лактатдегидрогеназа.

2. Экспериментально установлены пороговые дозы гидрозоля нанокompозита пектин-Ag: максимальная недействующая — 50 мг/кг и минимальная действующая — 500 мг/кг.

Заключение

Полученные результаты подтверждают опубликованные ранее данные об основных органах накопления НЧ серебра (печень, почки и селезенка) [16, 17]. При этом авторы публикаций отмечают, что проявления токсического эффекта связаны с механизмом действия наночастиц серебра *in vivo* — дозированном высвобождении ими цитотоксичных ионов серебра (Ag^+) под воздействием продуцируемых мононуклеарными клетками эндогенных окислителей (супероксид-анион, перекиси, перокси-нитрит, гипохлорит-ион и др.) в соответствующих органах-мишенях, а также реакции клеток на поверхность самих наночастиц. Дальнейшее нарушение функции митохондрий и системы синтеза АТФ клетки инициируют свободные радикалы и вторичные продукты реакций окислительного стресса [16, 17]. Также известно, что ионы серебра проявляют высокое сродство к серосодержащим белкам и к тиольной группе биомолекул в печени и других органах, и это может приводить к изменениям в ферментативном составе сыворотки крови [18].

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 2–10, 13–14, 18 см. в References)

1. Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы. *Успехи химии*. 2008; 77(3): 242-69.
11. Василькевич В.М., Михайлова Н.Н., Гилевская К.С., Куликовская В.И. О токсических свойствах гидрозоля наночастиц серебра, стабилизированных пектином. *Химическая безопасность*. 2019; 3(2): 67-77.
12. Василькевич В.М., Михайлова Н.Н., Крыж Т.И., Богданов Р.В., Гилевская К.С., Красковский А.Н. Оценка токсического воздействия гидрозоля наночастиц серебра, стабилизированных пектином, на организм крыс в подостром эксперименте. *Украинский журнал по проблемам медицины труда*. 2020; 16(1): 55-62.
15. Хрипач Л.В., Рахманин Ю.А., Михайлова Р.И., Князева Т.Д., Коганова З.И., Железняк Е.В. и др. Биохимические критерии в санитарно-токсикологических опытах на лабораторных животных — что нового несут рекомендации ОЭСР? В кн.: *IV-й съезд токсикологов России, Москва, 6-8 ноября 2013*. М., 2013: 533-6.
16. Рахманин Ю.А., Хрипач Л.В., Михайлова Р.И., Коганова З.И., Князева Т.Д., Железняк Е.В. и др. Сравнительный анализ влияния нано- и ионной форм серебра на биохимические показатели лабораторных животных. *Гигиена и санитария*. 2014; 1: 45-50.
17. Ковалева Н.Ю., Раевская Е.Г., Рошин А.В. Проблемы безопасности наноматериалов: нанобезопасность, нанотоксикология, наноинформатика. *Химическая безопасность*. 2017; 1(2): 44-87.

REFERENCES

1. Krutyakov Yu.A., Kudrinskiy A.A., Olenin A.Yu., Lisichkin G.V. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Uspehi khimii*. 2008; 77(3): 242-69. (In Russian)
2. Lu W., Senapati D., Wang S.G., Tovmachenko O., Singh A.K., Hongtao Yu. et al. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. *Chemical Physics Letters*. 2010; 487(1-3): 92-6. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.01.027>
3. Akter M., Sikder M.T., Rahman M.M., Ullah A.K.M.A., Kaniz Fatima Binte Hossain, Banik S. et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*. 2018; 9: 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.01.027>
4. Sharma V.K., Yngard R.A., Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2009; 145: 83-96. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002>

DOI: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-5-25-33>
Оригинальная статья

- Mohandas A., Deepthi S., Biswas R., Jayakumar R. Chitosan based metallic nanocomposite scaffolds as antimicrobial wound dressings. *Bioactive Materials*. 2018; 3(3): 267-77. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.003>
- Gherasim O., Puiu R.A., Birca A.C., Burdusel A.-C., Grumezescu A.M. An Updated Review on Silver Nanoparticles in Biomedicine. *Nanomaterials*. 2020; 10(11): 2318. <https://doi.org/10.3390/nano10112318>
- Deng H., McShan D., Zhang Y., Sinha S.S., Arslan Z., Ray P.C. et al. Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics. *Environ. Sci. Technol.* 2016; 50(16): 8840-8. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00998>
- Márquez J.C.M., Aida Hamdan Partida, María del Carmen Monroy Dosta, Jorge Castro Mejía, Jaime Amadeo Bustos Martínez. Silver nanoparticles applications (AgNPS) in aquaculture. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 2018; 6(2): 5-11.
- Hileuskaya K., Ladutska A., Kulikouskaya V., Kraskouski A., Novik G., Kozerzhets I. et al. 'Green' approach for obtaining stable pectin-capped silver nanoparticles: physico-chemical characterization and antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2020; 585: 124141. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124141>
- Al-Muhanna Muhanna K.A., Hileuskaya K.S., Kulikouskaya V.I., Kraskouski A.N., Agabekov V.E. Preparation of stable sols of silver nanoparticles in aqueous pectin solutions and properties of the sols. *Colloid Journal*. 2015; 77(6): 677-84.
- Vasilkevich V.M., Mikhailova N.N., Hileuskaya K.S., Kulikouskaya V.I. Toxicity behavior of hydrozole based on silver nanoparticles and stabilized by pectin. *Khimicheskaya Bezopasnost'*. 2019; 3(2): 67-77. (In Russian). DOI: 10.25514/CHS.2019.2.16003
- Vasilkevich V.M., Mikhailova N.N., Kryzh T.I., Bogdanov R.V., Hileuskaya K.S., Kraskouski A.N. Evaluation of the toxic influence of hydrozole of silver nanoparticles stabilized by pectin on the rat organism in a subsystem experiment. *Ukrainskiy zhurnal po problemam mediciny truda*. 2020; 16(1): 55-62. (In Russian). <https://doi.org/10.33573/ujoh2020.01.055>
- OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Health Effects. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788 (Accessed: 2 June 2020).
- Andriychuk N., Vlasik L. Subacute toxicity of decahedron and spherical silver nanoparticles in rats. *Ukrainskiy zhurnal sovremennykh problem toksikologii*. 2019; 2: 14-21. DOI: 10.33273/2663-4570-2019-86-2-14-21
- Hripach L.V., Rahmanin Ju.A., Mihajlova R.I., Knjazeva T.D., Koganova Z.I., Zheleznyak E.V. et al. Biochemical criteria in sanitary and toxicological experiments on laboratory animals - what is new in the OECD recommendations? In: *IV-th congress of toxicologists of Russia, Moscow, November 6-8 Moscow: 2013; 533-6 [IV-y s'ezd toksikologov Rossii, Moscow, 6-8 noyabrya, 2013]*. (In Russian)
- Rakhmanin Yu.A., Khripach L.V., Mikhaylova R.I., Koganova Z.I., Knyazeva T.D., Zheleznyak E.V. et al. Comparative analysis of the influence of nano- and ionic forms of silver on biochemical indices in laboratory animals. *Gigiena i Sanitariya*. 2014; 1: 45-50. (In Russian)
- Kovaleva N.Yu., Raevskaya E.G., Roshchin A.V. Aspects of nanomaterial safety: nanosafety, nanotoxicology, nanoinformatics. *Khimicheskaya Bezopasnost'*. 2017; 1(2): 44-87. (In Russian). DOI: 10.25514/CHS.2017.2.10982
- Tiwari, D.K., T. Jin, Behari J. Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2011; 21(1): 13-24. <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.529184>

ОБ АВТОРАХ:

Василькевич Вадим Михайлович (Vasilkevich Vadzim Michailovich), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории промышленной токсикологии республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены», г. Минск, Республика Беларусь. E-mail: sabas2004@mail.ru

Богданов Руслан Валерьевич (Bogdanov Ruslan Valerievich), кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией промышленной токсикологии республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены», г. Минск, Республика Беларусь. E-mail: 7_rus@tut.by

Гилевская Ксения Сергеевна (Gilevskaya Ksenia Sergeevna), кандидат химических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории микро- и наноструктурированных систем ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь.

Куликовская Виктория Игоревна (Kulikovskaya Victoria Igorevna), кандидат химических наук, доцент, заведующий лабораторией микро- и наноструктурированных систем ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь. E-mail: kulikouskaya@gmail.com

