

Субхроническая пероральная токсичность наночастиц серебра

Ён Сун Ким^{1,7}, Мун Ён Сон¹, Чон Дак Парк², Кён Сок Сон¹, Хён Рёл Рю¹, Ён Хён Чон³,
Хи Гён Чан⁴, Джи Хён Ли⁸, Кён Хуэй О⁵, Брюс Дж. Келман⁶, Ин Ку Хван⁷, Иль Дже Ю^{1,8*}

Абстрактный

Предыстория: Антибактериальный эффект наночастиц серебра привел к их широкому применению в медицинских, электронных, потребительских, медицинских, пестицидных и бытовых товарах; однако наночастицы серебра остаются спорной областью исследований в отношении их токсичности в биологических и экологических системах.

Результаты. В этом исследовании изучалась пероральная токсичность наночастиц серебра (56 нм) в течение 13 недель (90 дней) на крысах F344 в соответствии с руководством по испытаниям Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) 408 и надлежащей лабораторной практикой (GLP). Пятинедельных крыс массой около 99 г самцов и 92 г самок разделили на 4 группы (по 10 крыс в каждой группе): плацебо-контроль, низкая доза (30 мг/кг), средне- дозы (125 мг/кг) и высокие дозы (500 мг/кг). После 90 дней воздействия изучали клиническую химию, гематологию, гистопатологию и распределение серебра. Отмечено значительное снижение ($P < 0,05$) массы тела самцов крыс через 4 недели воздействия, хотя существенных изменений в потреблении пищи или воды в течение периода исследования не наблюдалось.

Значительные дозозависимые изменения были обнаружены в щелочной фосфатазе и холестерине у самцов и самок крыс, что указывает на то, что воздействие более 125 мг/кг наночастиц серебра может привести к легкому повреждению печени.

Гистопатологическое исследование выявило более высокую частоту гиперплазии желчных протоков с некрозом, фиброзом и/или пигментацией или без них у обработанных животных. Также наблюдалось дозозависимое накопление серебра во всех исследованных тканях. Отмечена гендерная разница в накоплении серебра в почках с двукратным увеличением в женских почках по сравнению с мужскими.

Выводы. Было обнаружено, что органом-мишенью для наночастиц серебра является печень как самцов, так и самок крыс. В настоящем исследовании предполагается, что NOAEL (уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов) составляет 30 мг/кг, а LOAEL (наименьший уровень наблюдаемых побочных эффектов) составляет 125 мг/кг.

Предыстория

Антибактериальная активность серебра, проявленная в ряде исследований [1-5], привела к широкому использованию наночастиц серебра в постельных принадлежностях, стиральных машинах, средствах для очистки воды, зубной пасте, шампунях и ополаскивателях, сосках и бутылочках для кормления, тканях, дезодорантах, фильтрах, кухонная утварь, игрушки и увлажнители [6,7], где основной корпус или внутренняя поверхность продукта смешана или покрыта стойким к микробам наносеребром для предотвращения роста грибков и бактерий. Несмотря на такое широкое использование продуктов, содержащих наночастицы серебра, данные о субхронической и хронической токсичности наночастиц серебра остаются редкими.

Отсутствие данных о воздействии наночастиц серебра на рабочем месте и наночастиц серебра, выбрасываемых из потребительских товаров или выбрасываемых в окружающую среду, делает

трудно оценить риски использования этих материалов. Имеются ограниченные данные о наночастицах серебра при ингаляционном и пероральном воздействии. Органами-мишенями для наночастиц серебра при субхронической ингаляции являются легкие и печень самцов и самок крыс [8]. В этом исследовании предполагалось, что NOAEL (уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов) составляет 100 мкг/м³.

LOAEL (наименьший наблюдаемый уровень побочных эффектов) и NOAEL были зарегистрированы для 28-дневного исследования пероральной токсичности с использованием крыс Sprague-Dawley и составили 300 мг/кг и 30 мг/кг соответственно [9]. В этом исследовании крысы F344 подвергались воздействию наночастиц серебра в соответствии с руководством по испытаниям Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) 408 (ОЭСР, 1998) с использованием 13-недельного протокола токсичности при многократном пероральном введении. Исследование проводилось в соответствии с Надлежащей лабораторной практикой. Клиническая химия, гистопатология и распределение

* Переписка: u1670916@chollian.net 1

Корейский институт тестирования окружающей среды и товаров, Инчхон, Корея
Полный список сведений об авторе доступен в конце статьи.

наночастицы серебра исследовали в крови, легких, почках, головном мозге, печени и других органах.

Материалы и методы

Наночастицы серебра

Наночастицы серебра (CAS № 7440-22-4) были приобретены у NAMATECH, Ltd. (Тэджон, Корея) и имели чистоту не менее 99,98%. Средний диаметр и геометрическое стандартное отклонение наночастиц серебра в 0,5% водной карбоксиметилцеллюлозе (CMC, Sigma USA), проанализированные с помощью просвечивающей электронной микроскопии, составили 56 нм и 1,46 соответственно (рис. 1).

Просвечивающая электронная

микроскопия. Фильтры, на которых отфильтровывались наночастицы серебра в 0,5% КМЦ, были покрыты углеродом, закрепленным

на сетке электронного микроскопа (200 меш, Veco, Eer beek, Holland) и визуализировали под трансмиссионным электронным микроскопом (ПЭМ, Hitachi 7100). Были измерены диаметры 400 случайно выбранных частиц при увеличении 50000х, а частицы серебра проанализированы с помощью энергодисперсионного рентгеновского анализатора (EDX-200, Horiba, Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Животные и условия

Четырехнедельные самцы и самки крыс Fisher 344, свободных от специфических патогенов (SPF), были приобретены у Japan SLC Inc. (Япония) и акклиматизированы в течение 7 дней перед началом экспериментов. В акклиматизационный и экспериментальный периоды крыс содержали в поликарбонатных клетках (максимум по 3 крысы в клетке) в помещении с регулируемой температурой.

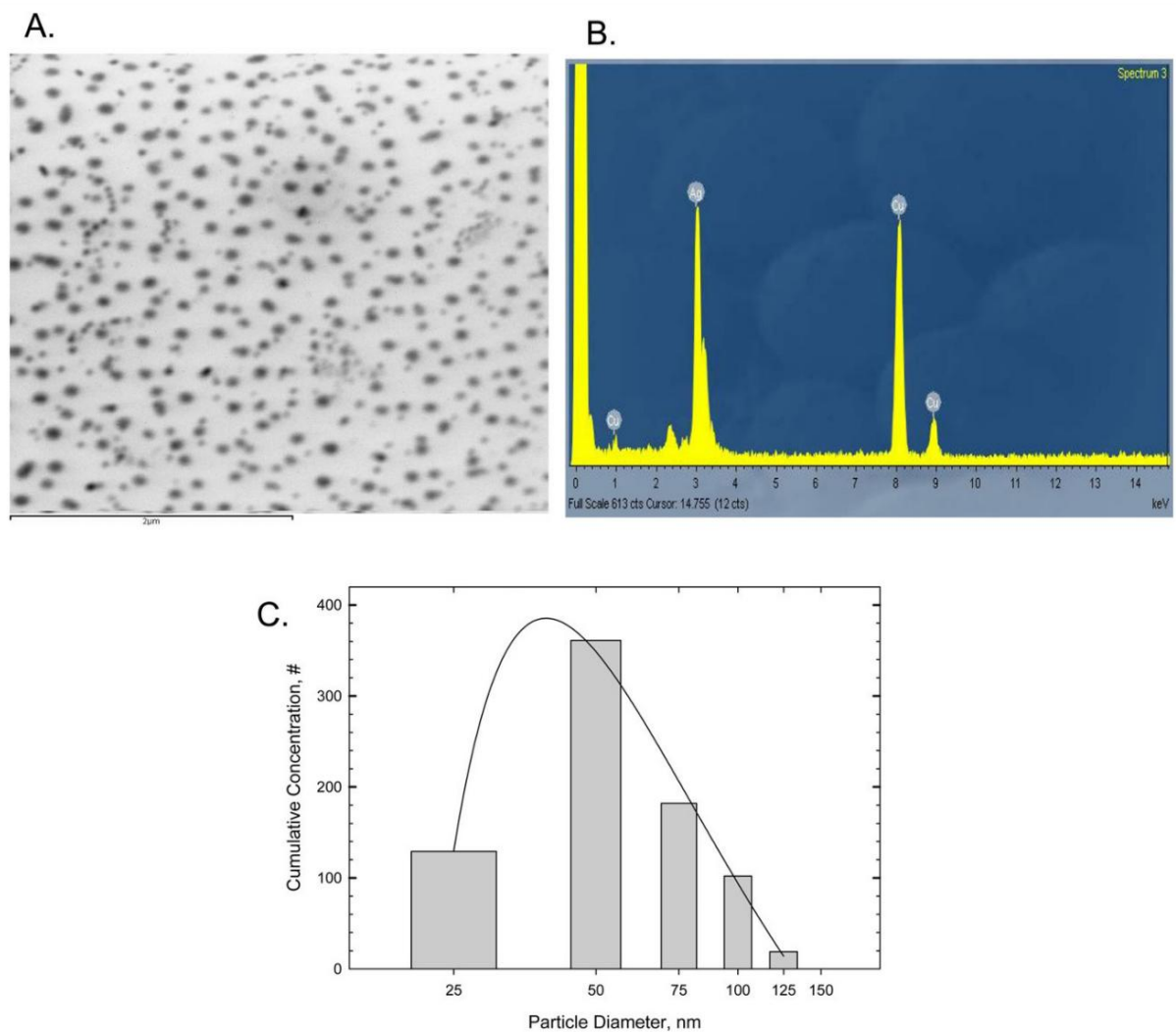


Рис. 1. Просвечивающая электронная микрофотография наночастиц серебра и распределение наночастиц серебра. Полоса указывает 2 мкм. А.

Трансмиссионная электронная микрофотография наночастиц серебра. В. Энергодисперсионный рентгеновский профиль (наночастицы серебра на медной сетке). С. Распределение наночастиц серебра.

температура ($22,2 \pm 1,7^\circ\text{C}$) и влажность ($48,4 \pm 6,0\%$), 12-часовой цикл свет/темнота. Крыс кормили диетой для грызунов (Harlan Teklad, США) и фильтровали воду вволю.

Крысы были разделены на 4 группы (по 10 крыс в каждой группе): контрольный носитель (0,5% карбоксиметилцеллюлоза, КМЦ), группа с низкой дозой (30 мг/кг/день), группа со средней дозой (125 мг/кг/день) и группа высоких доз (500 мг/кг/день). Когда крысы достигли пятинедельного возраста, они подвергались воздействию наночастиц серебра в соответствии с рекомендациями OECD по тестированию 408 [10] через желудочный зонд в течение 13 недель при повторном пероральном введении (объемы дозирования составляли 10 мл/кг). Уровни доз были выбраны на основе предыдущих наблюдений в ходе 28-дневного исследования пероральной токсичности, проведенного по методике NIOSH 7300 [11]. Исследование проводилось в соответствии с Надлежащей лабораторной практикой ОЭСР.

Клиническая химия и гематология В

конец 13-недельного эксперимента крысам было 18 недель. Перед вскрытием не кормили в течение 24 часов и крыс анестезировали газом CO₂.

Затем из брюшной аорты брали кровь, собирали в гепаринизированные вакутейнеры и анализировали на ALB (альбумин), ALP (щелочная фосфатаза), Ca (кальций), CHO (холестерин), CRE (креатинин), гамма-ГТ (гамма- глутамилтранспептидаза), GLU (глюкоза), GOT (глутаминовая щавелевоуксусная трансминаза), GPT (глутаминовая пировиноградная трансминаза), IP (неорганический фосфор), LDH (лактатдегидрогеназа), MG (магний), TP (общий белок), UA (мочевая кислота), BUN (азот мочевины крови), TBIL (общий билирубин), CK (креатинфосфокиназа), Na (натрий), K (калий), Cl (хлорид), TG (триглицерид) и A/G (отношение альбумина к глобулин) с помощью биохимического анализатора крови (Hitachi 7180, Hitachi, Япония). Кровь также анализировали на WBC (количество лейкоцитов), RBC (количество эритроцитов), Hb (концентрация гемоглобина), HTC (гематокрит), MCV (средний корпускулярный объем), MCH (средний корпускулярный гемоглобин), MCHC (средняя концентрация корпускулярного гемоглобина), RDW (ширина распределения эритроцитов), PLT (количество тромбоцитов), MPV (средний объем тромбоцитов), NE# (количество нейтрофилов), NE% (процент нейтрофилов), LY# (количество лимфоцитов), LY% (процент лимфоцитов), MO# (количество моноцитов), MO% (процент моноцитов), EO# (количество эозинофилов), EO% (процент эозинофилов), BA# (количество базофилов) и BA% (процент базофилов) с использованием счетчика клеток крови (Hemavet 0950, CDC Tech., США).

Вес органов и гистопатология После сбора

образцов крови крыс умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Надпочечники, мочевой пузырь, яички, яичники, матка, придатки яичек, семенные пузырьки, сердце, вилочковая железа, щитовидная железа, трахея, пищевод, язык, простата, легкие, носовая полость, почки, селезенка, печень, поджелудочная железа и головной мозг

осторожно извлекали, взвешивали и фиксировали в 10% растворе формалина, содержащем нейтральный фосфатно-солевой буфер. После этого органы заливали в парафин, окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали под световой микроскопией.

Определение тканевого серебра .

Ткани расщепляли конц. азотной кислоты с использованием системы микроволнового разложения (MARS 230/60, CEM). Концентрацию серебра в сброженной жидкости анализировали беспламенным методом на атомно-абсорбционном спектрофотометре с графитовой печью Зеемана (Perkin Elmer 5100ZL, Zeeman Furnace Module, США) по методике NIOSH 7300 [11]. Концентрацию серебра в ткани выражали в мкг/г сырого веса.

Статистический

анализ Статистический анализ был выполнен с помощью SPSS (версия 12). Статистическую оценку проводили путем анализа двустороннего критерия Стьюдента или дисперсионного анализа (ANOVA) после множественных сравнительных тестов по методу Дункана. Уровень статистической значимости был установлен на уровне $p < 0,05$.

Результаты

Наблюдение за животными, потребление пищи и влияние на массу тела и органов Не было выявлено существенных различий в потреблении пищи и потреблении воды между обработанными самцами и самками крыс и контрольной группой (данные не представлены). Значимых дозозависимых изменений массы тела самок крыс не наблюдалось; однако наблюдалось значительное ($P < 0,05$) дозозависимое снижение массы тела у самцов крыс, получавших высокие дозы через 4, 5 и 7 недель воздействия по завершении исследования через 13 недель, и у самцов крыс, получавших средние дозы через 13 недель. 10 недель экспозиции (рис. 2). Через 90 дней ни у самцов, ни у самок крыс не наблюдалось значительных изменений веса органов, за исключением увеличения ($P < 0,05$) веса левого семенника у самцов крыс, получавших высокие дозы, и снижения ($P < 0,05$) в массе правой почки у низко- и среднедозированных самок крыс (табл. 1 и 2).

Воздействие на клиническую биохимию и гематологию .

Оказалось, что увеличение ЩФ у самцов крыс в группах со средней и высокой дозой статистически не значимо (таблица 3). Однако наблюдалось значительное увеличение ($P < 0,01$) уровня щелочной фосфатазы (ЩФ) у самок крыс в группах с высокими дозами (таблица 4). Значительное увеличение ($P < 0,01$) уровня холестерина было также обнаружено у самцов крыс, получавших средние и высокие дозы, и у самок крыс, получавших высокие дозы (таблицы 3 и 4). Значительное увеличение ($P < 0,05$) общего билирубина было отмечено у самцов крыс, получавших средние дозы.

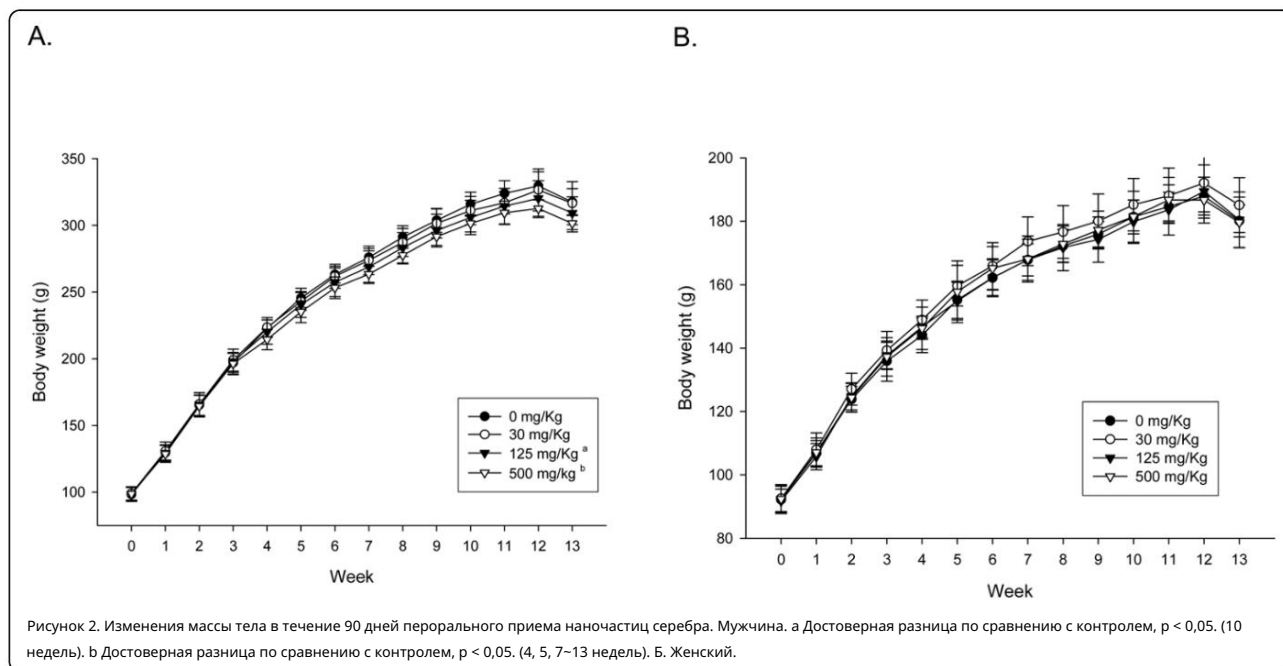


Таблица 1. Относительная масса органов самцов крыс после 90-дневного перорального введения наночастиц серебра (среднее значение \pm стандартное отклонение, $n = 9$)

	Доза (мг/кг)			
	0	30	125	500
Яичко (слева)	0,47 \pm 0,02	0,48 \pm 0,03	0,49 \pm 0,02	0,51 \pm 0,01*
Яичко (справа)	0,47 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02	0,49 \pm 0,02
Селезенка	0,21 \pm 0,03	0,21 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,20 \pm 0,02
Печень	2,96 \pm 0,10	2,91 \pm 0,16	2,92 \pm 0,09	2,87 \pm 0,11
Гипофиз	0,002 \pm 0,001	0,003 \pm 0,001	0,005 \pm 0,006	0,004 \pm 0,003
Надпочечник (Левый)	0,011 \pm 0,006	0,007 \pm 0,002	0,008 \pm 0,001	0,009 \pm 0,003
Надпочечник (Верно)	0,008 \pm 0,001	0,007 \pm 0,001	0,008 \pm 0,001	0,009 \pm 0,002
Предстательная железа	0,13 \pm 0,06	0,16 \pm 0,05	0,15 \pm 0,04	0,16 \pm 0,05
Легкие	0,42 \pm 0,02	0,41 \pm 0,04	0,42 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03
Мозг	0,62 \pm 0,02	0,61 \pm 0,03	0,62 \pm 0,02	0,63 \pm 0,02
Сердце	0,27 \pm 0,02	0,26 \pm 0,02	0,27 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02
Тимус	0,10 \pm 0,02	0,10 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,10 \pm 0,02
Почка (слева)	0,28 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02	0,29 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01
Почка (справа)	0,29 \pm 0,02	0,28 \pm 0,02	0,29 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01

* Достоверная разница с контролем, $p < 0,05$

Таблица 2 Относительная масса органов самок крыс после 90-дневного перорального введения наночастиц серебра (среднее \pm S. Д., $n = 9$)

	Доза (мг/кг)			
	0	30	125	500
Яичник (слева)	0,027 \pm 0,004	0,026 \pm 0,005	0,023 \pm 0,003	0,024 \pm 0,007
Яичник (справа)	0,072 \pm 0,134	0,025 \pm 0,006	0,026 \pm 0,003	0,028 \pm 0,005
Селезенка	0,22 \pm 0,02	0,21 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,21 \pm 0,02
Печень	2,67 \pm 0,18	2,61 \pm 0,07	2,53 \pm 0,12	2,62 \pm 0,17
Гипофиз	0,007 \pm 0,002	0,006 \pm 0,002	0,006 \pm 0,001	0,007 \pm 0,002
Надпочечник (Левый)	0,015 \pm 0,003	0,014 \pm 0,002	0,014 \pm 0,001	0,015 \pm 0,003
Надпочечник (Верно)	0,014 \pm 0,001	0,014 \pm 0,002	0,014 \pm 0,002	0,015 \pm 0,001
матка	0,233 \pm 0,044	0,257 \pm 0,090	0,216 \pm 0,040	0,195 \pm 0,040
Легкие	0,54 \pm 0,06	0,55 \pm 0,04	0,50 \pm 0,05	0,54 \pm 0,05
Мозг	0,99 \pm 0,05	0,98 \pm 0,05	0,99 \pm 0,06	1,00 \pm 0,05
Сердце	0,32 \pm 0,02	0,32 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	0,32 \pm 0,03
Тимус	0,14 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02
Почка (слева)	0,31 \pm 0,02	0,30 \pm 0,02	0,30 \pm 0,01	0,30 \pm 0,02
Почка (справа)	0,31 \pm 0,02	0,29 \pm 0,01*	0,30 \pm 0,01*	0,30 \pm 0,02

* Достоверная разница с контролем, $p < 0,05$

Таблица 5. Гематологические показатели у самцов крыс после 90-дневного перорального введения наночастиц серебра (среднее значение ± стандартное отклонение)

	Доза (мг/кг)			
	0 (n = 9)	30 (n = 9)	125 (n = 10)	500 (n = 10)
Лейкоциты	8,33 ± 1,25	8,22 ± 1,44	8,17 ± 1,28	8,21 ± 1,07
РБК	8,98 ± 0,32	9,13 ± 0,66	8,88 ± 0,24	9,07 ± 0,35
Hb	16,67 ± 0,40	16,76 ± 1,10	16,47 ± 0,53	16,93 ± 0,68
НСТ	36,96 ± 1,41	37,80 ± 2,90	36,97 ± 1,46	37,84 ± 2,12
MCV	41,17 ± 0,58	41,38 ± 0,72	41,62 ± 0,77	41,72 ± 0,92
МЧ	18,58 ± 0,34	18,34 ± 0,40	18,55 ± 0,58	18,67 ± 0,37
МСНС	45,13 ± 1,08	44,38 ± 1,31	44,59 ± 1,69	44,79 ± 1,25
РДВ	17,98 ± 0,78	17,83 ± 0,68	17,83 ± 1,04	18,10 ± 0,86
PLT	738,22 ± 53,33	731,56 ± 105,79	725,40 ± 45,43	718,50 ± 72,05
МПВ	6,86 ± 0,29	6,84 ± 0,19	6,83 ± 0,27	6,64 ± 0,28
НЭУ	26,13 ± 3,30	26,72 ± 3,14	26,76 ± 4,14	27,12 ± 2,62
ЛИО	69,77 ± 3,39	68,21 ± 3,45	68,93 ± 5,30	69,34 ± 3,13
МОНО	3,78 ± 0,80	4,57 ± 1,12	3,98 ± 1,19	3,35 ± 0,80
ЭОС	0,25 ± 0,40	0,39 ± 0,50	0,25 ± 0,21	0,15 ± 0,08
БАЗОВ	0,08 ± 0,14	0,12 ± 0,22	0,09 ± 0,08	0,04 ± 0,03

Примечание. WBC(К/мкл), лейкоциты; RBC(М/мкл), эритроциты; Hb(г/дл), гемоглобин; НСТ(%), гематокрит; MCV(f), средний корпускулярный объем; MCH (pg), средний корпускулярный гемоглобин; МСНС(г/дл), средняя концентрация корпускулярного гемоглобина; RDW(%), ширина распределения эритроцитов; PLT (К/мкл), тромбоциты; MPV(f), средний объем тромбоцитов; NEU(%), нейтрофилы; LYО(%), лимфоциты; МОНО(%), моноциты; EOS(%), эозинофилы; BASO(%), базофилы.

Таблица 6. Гематологические показатели для самок крыс после 90-дневного перорального введения наночастиц серебра (среднее значение ± стандартное отклонение).

	Доза (мг/кг)			
	0 (n = 8)	30 (n = 10)	125 (n = 10)	500 (n = 9)
Лейкоциты	5,46 ± 1,36	5,42 ± 0,81	5,11 ± 0,67	5,90 ± 0,97
РБК	8,46 ± 0,22	8,41 ± 0,34	8,19 ± 0,32	8,28 ± 0,24
Hb	16,24 ± 0,81	16,16 ± 0,75	15,82 ± 1,02	16,14 ± 0,85
НСТ	34,45 ± 2,50	34,40 ± 1,80	34,33 ± 1,82	34,51 ± 2,13
MCV	40,70 ± 1,96	40,91 ± 1,62	41,95 ± 1,81	41,71 ± 2,45
МЧ	19,20 ± 0,56	19,24 ± 0,81	19,34 ± 1,36	19,50 ± 0,96
МСНС	47,21 ± 1,80	47,02 ± 1,63	46,09 ± 1,96	46,84 ± 2,41
РДВ	19,33 ± 2,44	19,18 ± 2,62	18,85 ± 2,55	19,04 ± 2,46
PLT	765,75 ± 110,30	718,30 ± 68,56	712,70 ± 55,93	688,89 ± 34,71
МПВ	6,56 ± 0,71	6,74 ± 0,21	6,95 ± 0,28	6,70 ± 0,22
НЭУ	24,93 ± 2,88	27,37 ± 3,70	26,32 ± 6,70	24,06 ± 3,49
ЛИО	71,48 ± 3,83	68,32 ± 4,60	69,59 ± 7,53	71,22 ± 3,83
МОНО	3,00 ± 1,17	3,85 ± 1,13	3,65 ± 0,79	4,54 ± 0,60*
ЭОС	0,42 ± 0,52	0,36 ± 0,17	0,39 ± 0,37	0,18 ± 0,15
БАЗО	0,17 ± 0,25	0,11 ± 0,09	0,15 ± 0,19	0,01 ± 0,02

Примечание. WBC(К/мкл), лейкоциты; RBC(М/мкл), эритроциты; Hb(г/дл), гемоглобин; НСТ(%), гематокрит; MCV(f), средний корпускулярный объем; MCH (pg), средний корпускулярный гемоглобин; МСНС(г/дл), средняя концентрация корпускулярного гемоглобина; RDW(%), ширина распределения эритроцитов; PLT (К/мкл), тромбоциты; MPV(f), средний объем тромбоцитов; NEU(%), нейтрофилы; LYО(%), лимфоциты; МОНО(%), моноциты; EOS(%), эозинофилы; BASO(%), базофилы.

* Достоверная разница с контролем, $p < 0,05$

Таблица 7. Количество ретикулоцитов у самцов и самок крыс после 90-дневного перорального введения наночастиц серебра (n = 5, EA/1000, среднее ± SD)

	Доза (мг/кг)			
	0	30	125	500
Мужской	10,00 ± 4,69	8,40 ± 4,72	6,10 ± 2,13	5,80 ± 2,74
Женщины	12,22 ± 4,84	6,70 ± 3,74*	12,10 ± 5,82	11,90 ± 3,90

* Достоверная разница с контролем, $p < 0,05$

10 и 2/10 контроля, самок крыс с низкой, средней и высокой дозой соответственно (таблица 8 и 9, рисунок 4B и 4D). Более высокая частота гиперплазии желчных протоков с некрозом, фиброзом и/или пигментацией или без них у леченных животных также предполагает эффект, связанный с лечением.

Хотя в почках самцов крыс, получавших высокие дозы, наблюдалось небольшое увеличение минимальной канальцевой базофилии, эти изменения не были статистически значимыми и, таким образом, не считались связанными с воздействием испытуемого препарата. Тубулярная базофилия также была более распространена у самцов крыс по сравнению с самками (таблица 8). Минимальная или умеренная почечная односторонняя или двусторонняя минерализация наблюдалась у 5/10, 8/10, 7/10 и 9/10 контрольных самок крыс, получавших низкие, средние и высокие дозы соответственно, что указывает на связанное с лечением эффект.

Гистопатологическое исследование легочной ткани не выявило эффектов, связанных с лечением.

В кишечнике пигментация ворсин наблюдалась у 0/10, 0/10, 8/10 и 8/10 контрольных, низко-, средне- и высокодозированных крыс-самцов соответственно (табл. 8). Это дозозависимое увеличение пигментации ворсинок указывало на очевидный эффект, связанный с лечением (рис. 5). Напротив, у самок крыс наблюдалось небольшое связанное с лечением усиление пигментации кишечных ворсинок (таблица 9).

Распределение серебра в тканях

В этом исследовании наблюдалось статистически значимое ($P < 0,01$) дозозависимое увеличение концентрации серебра во всех образцах тканей из групп, подвергшихся воздействию наночастиц серебра (таблица 10). Кроме того, накопление серебра в почках самок крыс в два раза выше по сравнению с крысами-самцами во всех дозовых группах, что свидетельствует о заметном распределении в зависимости от пола.

Обсуждение

Наночастицы серебра широко используются в качестве бактерицидных агентов в потребительских товарах, но их потенциальное воздействие на человека остается малоизученным. Серебро в дозах ниже уровней, вызывающих аргирию или аргириоз, обычно считается относительно нетоксичным [12]. Вейнховен и др. предположили, что токсическое действие серебра

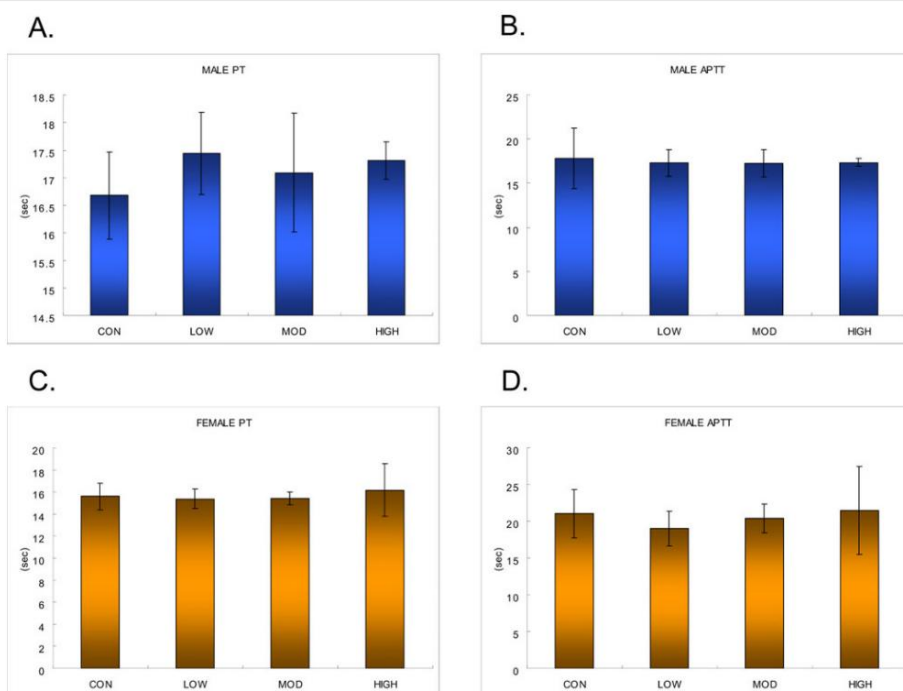


Рисунок 3. Время коагуляции у самцов и самок крыс: А, протромбиновое время самцов (PT); В, мужское активное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ); С, женский PT; D, женский АРТТ. (Полосы погрешностей указывают на стандартное отклонение.)

пропорциональны свободным ионам серебра, но неясно, как это относится к наночастицам серебра. Было показано, что абсорбция серебра после перорального приема подвергается эффекту первого прохождения через печень, что приводит к экскреции с желчью [13]. Показано, что неочищенное серебро откладывается в базальной мембране почечных клубочков [14–17], мезангии [18], клетках Купфера и клетках эндотелия синусоид печени [15].

В отличие от 28-дневного исследования Kim et al. [9], настоящее исследование показывает пигментацию кишечника и эффекты от воздействия наночастиц серебра. Дозозависимое увеличение концентрации серебра в кишечных ворсинках, наблюдаемое в этом и других отчетах [19], а также в крови указывает на то, что перорально абсорбированное серебро из наночастиц способно проникать в кровотоки и распределяться в другие органы. Поскольку о подобных эффектах для растворимого серебра ранее не сообщалось, существует вероятность, что эти эффекты связаны с частицами, а не с ионизированным серебром.

Увеличение почечного серебра, о котором сообщалось в текущем исследовании, согласуется с литературными данными, показывающими, что ионизированное серебро откладывается в базальной мембране почечных клубочков [14–17] и мезангии [18]. Распределение наночастиц серебра в почках в зависимости от пола также соответствовало результатам 28-дневных [9], 90-дневных пероральных и 90-дневных ингаляционных исследований [8]. Средние размеры наночастиц, используемых в 28-дневных и 90-дневных ингаляционных экспериментах, составляли 15 нм и 18–19 нм соответственно, в то время как

средний размер наночастиц, использованных в 28-дневных и 90-дневных исследованиях пероральной токсичности, составлял 60 нм и 56 нм соответственно. Общие конечные точки и распределение, связанные с лечением, были обнаружены во всех этих исследованиях, что указывает на то, что распределение и токсичность, по-видимому, не зависят от размера частиц в тестируемом диапазоне или пути введения.

В предыдущих отчетах было показано, что органами-мишенями для наночастиц серебра являются печень в 28-дневном исследовании оральной токсичности [9] и легкие в 90-дневном ингаляционном исследовании [8]. Результаты текущего исследования согласуются с предыдущими отчетами в отношении печени как органа-мишени и распределения в тканях серебра, происходящего из наночастиц. Токсичность печени, оцененная с помощью гистопатологии, включала гиперплазию желчных протоков и увеличенные очаги, что согласуется с патологическими наблюдениями в исследованиях 28-дневной [9] пероральной токсичности и 90-дневной ингаляционной [8] токсичности. Повышение уровня щелочной фосфатазы и холестерина также соответствовало гепатотоксичности, о которой сообщали Kim et al. и Сунг и др.

В отличие от 90-дневного ингаляционного исследования, эффектов коагуляции в периферической крови не наблюдалось. Поскольку в двух исследованиях наблюдается сходная патология печени, неясно, было ли увеличение времени свертывания вызвано повреждением печени в ингаляционном исследовании или каким-то другим механизмом.

Было показано, что вдыхаемые наночастицы серебра вызывают воспаление легких [8]. Эти эффекты могут быть связаны с размером частиц, поскольку наночастицы золота (которые не

Таблица 8 Гистопатологические данные для самцов крыс после 90-дневного перорального введения наночастиц серебра

ГРУППА	Количество животных		Контроль		Низкий		Середина		Высокий		
			10	10	10	10	10	10			
	Н	%	Н	%	Н	%	Н	%	Н	%	
Печень	Нет микроскопических находок		5/10	50	3/10	30	0/10	0	3/10	30	
	Нарушение		5/10	50	7/10	70	10/10	100	7/10	70	
	Гиперплазия	желчный проток	минимум	4/10	40	7/10	70	8/10	80	6/10	60
			мягкий	0/10	0	0/10	0	1/10	10	0/10	0
	Вакуолизация	гепатоцеллюлярный	минимум	1/10	10	0/10	0	0/10	0	0/10	0
	Некроз	фокальный	минимум	0/10	0	4/10	40	3/10	30	4/10	40
			умеренный	0/10	0	0/10	0	1/10	10	0/10	0
	дольчатый	умеренный	0/10	0	0/10	0	1/10	10	0/10	0	
	мультифокальный	умеренный	0/10	0	0/10	0	1/10	10	0/10	0	
	Кровотечение	0/10	0	0/10	0	1/10	10	0/10	0		
Пигментация	0/10	0	1/10	10	0/10	0	2/10	20			
почки	Нет микроскопических находок		10/10	100	10/10	100	9/10	90	6/10	60	
	Нарушение		0/10	0	0/10	0	1/10	10	4/10	40	
	Базофилия	трубчатый	минимум	0/10	0	0/10	0	1/10	10	2/10	20
	Воспаление	фокальный	минимум	0/10	0	0/10	0	0/10	0	1/10	10
			трубчатый	минимум	0/10	0	0/10	0	0/10	0	1/10
Легкие	Нет микроскопических находок		9/10	90	10/10	100	9/10	90	7/10	70	
	Нарушение		1/10	10	0/10	0	1/10	10	3/10	30	
	Воспаление	фокальный	минимум	1/10	10	0/10	0	0/10	0	1/10	10
	гистоцитоз	0/10	0	0/10	0	1/10	10	0/10	0		
	Минимум минерализации	0/10	0	0/10	0	0/10	0	2/10	20		
антракоз	0/10	0	0/10	0	0/10	0	1/10	10			
кишечник	Нет микроскопических находок		10/10	100	10/10	100	2/10	20	2/10	20	
	Нарушение		0/10	0	0/10	0	8/10	80	8/10	80	
	пигмент	крупный	желтый	0/10	0	0/10	0	1/10	10	8/10	80
бледно-желтый			0/10	0	0/10	0	7/10	70	0/10	0	
Сердце	Нет микроскопических находок		10/10	100	10/10	100	8/10	80	8/10	80	
	Нарушение		0/10	0	0/10	0	2/10	20	2/10	20	
	Воспаление	левый желудочек	минимум	0/10	0	0/10	0	2/10	20	1/10	10
правый желудочек			минимум	0/10	0	0/10	0	0/10	0	1/10	10
Глаза	Нет микроскопических находок		10/10	100	10/10	100	10/10	100	9/10	90	
	Нарушение		0/10	0	0/10	0	0/10	0	1/10	10	
поджелудочная железа	Нет микроскопических находок		10/10	100	10/10	100	10/10	100	8/10	80	
	Нарушение		0/10	0	0/10	0	0/10	0	2/10	20	
	Воспаление	поджелудочная железа	минимум	0/10	0	0/10	0	0/10	0	2/10	20

могут быть ионизированы) показывают аналогичные эффекты [20]. Наши очень ограниченные данные заставляют предположить, что эффекты от наночастиц серебра обусловлены не только ионизацией серебра с поверхности наночастиц серебра, но могут быть обусловлены (по крайней мере частично) прямым воздействием наночастиц. Взаимосвязь между эффектом частиц и эффектом ионизированного серебра можно проверить путем количественного исследования тканей-мишеней на наличие

присутствия наночастиц с одновременным измерением содержания ионизированного серебра в ткани, в отличие от измерения только общего содержания серебра в ткани. Если наночастицы серебра имеют эффекты, связанные с частицами, которые специфичны для тканей и значительны по сравнению с эффектами ионизированного серебра, будет важно учитывать такие различия в будущих оценках профессиональных и экологических рисков.

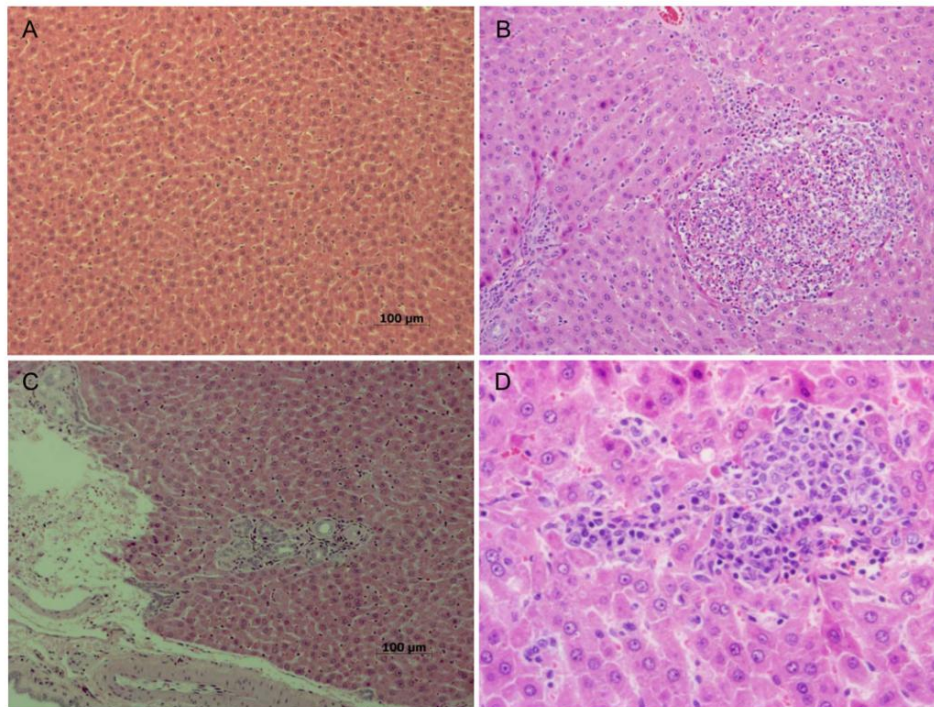


Рисунок 4. Гистопатологические данные в печени: (A) контрольная печень, (B) множественные очаги воспалительных клеточных инфильтратов, включая эозинофилы, особенно вокруг центральной вены и портальных областей (C) гиперплазия желчных протоков и (D) несколько очагов воспалительно-клеточной инфильтрации, особенно вокруг центральной вены и синусоид на печеночных дольках. Полоса указывает 100 мкм. А. Контроль ($\times 100$). В. Высокая доза ($\times 100$). С. Высокая доза ($\times 100$). D. Высокая доза ($\times 200$).

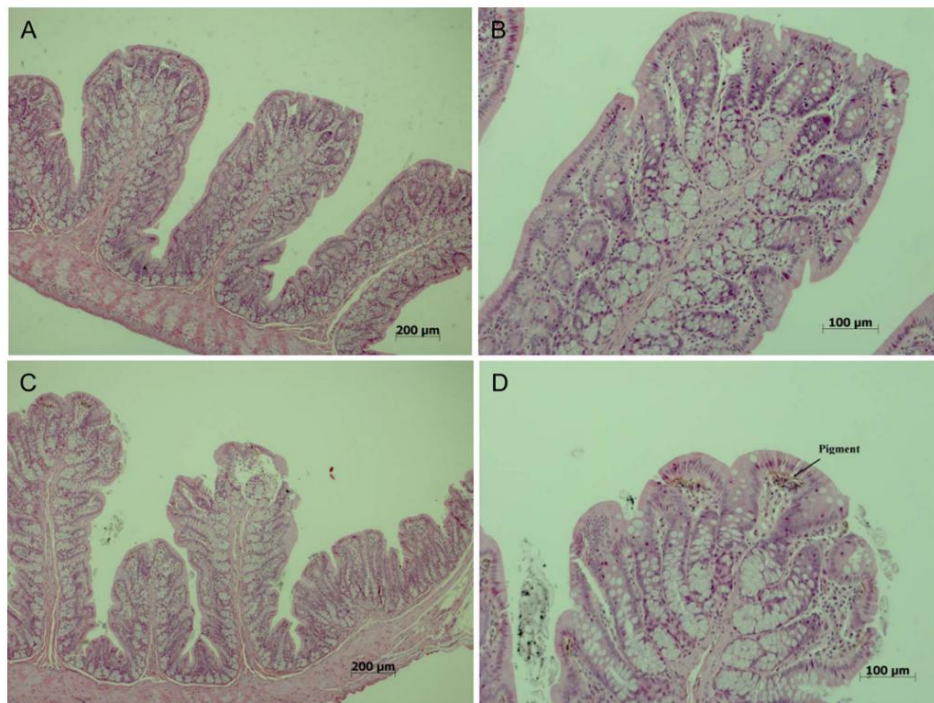


Рисунок 5. Гистопатологические данные в кишечнике самцов крыс, получавших 500 мг/кг наночастиц серебра в течение 90 дней. А. Контрольный самец ($\times 40$). В. Контрольный самец ($\times 100$). С. Мужчина, получавший высокую дозу ($\times 40$). D. Мужчина, получавший высокую дозу ($\times 100$).

Таблица 9 Гистопатологические данные для самок крыс после 90-дневного перорального введения наночастиц серебра

ГРУППА		Контроль		Низкий		Середина		Высокий			
		10	10	10	10	10	10	10	10		
Количество животных		Н	% Н	Н	%	Н	% Н	Н	% Н		
Печень	Нет микроскопических находок	5/10	50	2/10	20	2/10	20	3/10	30		
	Нарушение	5/10	50	8/10	80	8/10	80	7/10	70		
	Гиперплазия	желчный проток	минимум	3/10	30	7/10	70	8/10	80	7/10	70
	Некроз	фокальный	минимум	0/10	0	2/10	20	2/10	20	1/10	10
		центральная вена		0/10	0	0/10	0	0/10	0	1/10	10
	Фиброз		минимум	2/10	20	1/10	10	2/10	20	1/10	10
	Пигментация		0/10	0	0/10	0	4/10	40	1/10	10	
почки	Нет микроскопических находок	5/10	50	2/10	20	3/10	30	1/10	10		
	Нарушение	5/10	50	8/10	80	7/10	70	9/10	90		
	Минерализация	односторонний	минимум	4/10	40	7/10	70	5/10	50		
			мягкий	0/10	0	0/10	0	1/10	10	0/10	0
		двусторонний	минимум	1/10	10	1/10	10	1/10	10	4/10	40
Легкие	Нет микроскопических находок	10/10	100	10/10	100	9/10	90	10/10	100		
	Нарушение	0/10	0	0/10	0	1/10	10	0/10	0		
	гистоцитоз	0/10	0	0/10	0	1/10	10	0/10	0		
кишечник	Нет микроскопических находок	10/10	100	10/10	100	10/10	100	5/10	50		
	Нарушение	0/10	0	0/10	0	0/10	0	5/10	50		
	пигмент	крупный	желтый	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/10	0
		бледно-желтый	0/10	0	0/10	0	0/10	0	5/10	50	
Глаза	Нет микроскопических находок	8/10	80	9/10	90	9/10	90	9/10	90		
	Нарушение	2/10	20	1/10	10	1/10	10	1/10	10		
	Воспаление	Минимум	гардериановой железы	2/10	20	1/10	10	1/10	10	0	
Поджелудочная железа	Нет микроскопических данных	10/10	100	10/10	100	10/10	100	9/10	90		
	Нарушение	0/10	0	0/10	0	0/10	0	1/10	10		
	Воспаление	поджелудочная железа	минимум	0/10	0	0/10	0	0/10	0	1/10	10

Таблица 10 Содержание серебра в тканях после 90-дневного перорального введения наночастиц серебра

Доза/пол	Серебро (мкг/г сырого веса)					
	Яички	Печень	почки	Мозг	Легкие	Кровь
0 мг/кг						
Мужской	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,08	0,001 ± 0,000
Женский		0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,02	0,002 ± 0,002
30 мг/кг						
Мужской	6,56 ± 0,33**	4,20 ± 1,57** ^a	6 1,49 ± 0,37**	0,47 ± 0,18**	6 1,94 ± 0,64**	0,111 ± 0,016**
Женский		8,56 ± 3,22** ^a	6 7,98 ± 0,91**	0,38 ± 0,05**	6 4,97 ± 0,90	0,087 ± 0,017**
125 мг/кг						
Мужской	11,84 ± 1,62**	10,19 ± 2,09** ^б	6 8,82 ± 2,13**	0,69 ± 0,06**	10,97 ± 3,81**	0,191 ± 0,037** ^б
Женский		29,13 ± 9,74** ^б	6 37,09 ± 17,44**	0,77 ± 0,11**	17,64 ± 9,06**	0,122 ± 0,010** ^б
500 мг/кг						
Мужской	23,75 ± 9,13**	68,65 ± 33,59**	6 99,19 ± 32,82**	3,54 ± 1,44**	56,04 ± 51,14	0,419 ± 0,083**
Женский		98,75 ± 31,65**	6 226,88 ± 55,64**	3,70 ± 1,17**	45,83 ± 11,43**	0,303 ± 0,099**

** Достоверная разница по сравнению с контролем, p < 0,01. (ANOVA)

^a Достоверная разница по сравнению с различием пола, p < 0,05. (Т-тест)^б Достоверная разница по сравнению с различием пола, p < 0,01. (Т-тест)

Выводы На

основании текущего 90-дневного исследования токсичности при пероральном приеме предполагается LOAEL (минимальный уровень наблюдаемых побочных эффектов) 125 мг/кг и NOAEL (уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов) 30 мг/кг. НУНВВ, полученный в этом исследовании, значительно ниже, чем НУНВВ в 300 мг/кг, полученный в ходе 28-дневного исследования пероральной токсичности (Kim et al., 2008). Однако УННВВ, полученный в результате этого исследования, согласуется с УННВВ в 30 мг/кг, полученным в результате 28-дневного перорального исследования (Kim et al., 2008).

Благодарности Средства, связанные с «Созданием инфраструктуры для стандартизации нанотехнологий» от Ассоциации исследований в области нанотехнологий.

Сведения об авторе

¹Корейский институт тестирования окружающей среды и товаров, Инчхон, Корея.
²Медицинский колледж Университета Чун-Анг, Сеул, Корея. ³Медицинский и Центр медицинских исследований, KOSHA, Тэджон, Корея. ⁴колледж химической Университет Косин, Пусан, Корея. ⁵безопасности, Корейское агентство по технологиям и Качкон, Корея. ⁶стандартам, Veritox, Inc., Сиэтл, США. ⁷колледж ветеринарной медицины Сеульского национального университета, Сеул, Корея. ⁸научно-исследовательский институт термоядерных технологий, Университет Хосею, Асан, Корея.

Вклад авторов JY возглавил

исследование и провел патологический анализ вместе с MYS, YHC, HKC, IHC и составил рукопись вместе с YSK и BK. YSK возглавлял все процедуры по лечению животных с помощью MYS, KSS и HRR. JDP и JHL внесли свой вклад в исследование распределения. JY, BK и KHO задумали и разработали исследование. Все авторы рассмотрели и интерпретировали данные, прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Конкурирующие интересы

Авторы заявляют, что у них нет конкурирующих интересов.

Получено: 23 февраля 2010 г. Принято: 6 августа 2010 г.

Опубликовано: 6 августа 2010 г.

Ссылки 1. Sondi

- Salopek-Sondi B: Наночастицы серебра как антимикробный агент: Тематическое исследование. E. coli как модель для грамотрицательных бактерий. *J Colloid Interface Sci* 2004, 275:177-182.
- Чо К. Х., Парк Дж. Э., Осака Т., Парк С. Г.: Изучение антимикробной активности и консервирующего действия ингредиента наносеребра. *Электроникс. Acta* 2005, 51:956-960.
- Li P, Li J, Wu C, Wu Q, Li J: Синергетический антибактериальный эффект б-лактамоного антибиотика в сочетании с наночастицами серебра. *Нанотехнологии* 2005, 16:1912-1917.
- Моронес Дж. Р., Элечигуэрра Дж. Л., Камачо А., Холт К., Коури Дж. Б., Якамман М. Дж.: Бактерицидный эффект наночастиц серебра. *Нанотехнологии* 2005, 16:2346-2353.
- Ji JH, Bae GN, Yun SH, Jung JH, Noh HS, Kim SS: Оценка серебра генератор наночастиц с использованием небольшого керамического нагревателя для инaktivации биоаэрозолей *S. epidermidis*. *Aerosol Sci Technol* 2007, 41:786-793.
- Мейнард А.Д.: Нанотехнологии: исследовательская стратегия для устранения рисков. Вашингтон, округ Колумбия: Международный центр ученых Вудро Вильсона, 2006 г.
- KISTI (Корейский институт науки и технической информации): Современное состояние корейской индустриализации нанотехнологий. *Nano Weekly* 210 Сеул, Корея: KISTI 2006.
- Сон Дж. Х., Джи Дж. Х., Пак Дж. Д., Юн Джу, Ким Д. С., Чон К. С., Сон М.И., Чон Дж. Han BS, Han JH, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Cho MH, Kelman BJ, Yu JI: Субхроническая ингаляционная токсичность наночастиц серебра. *Toxicol Sci* 2009, 108(2):452-61.
- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH: Противомикробное действие наночастиц серебра. *Наномедицина* 2007, 3:95-101.

- Организация экономического сотрудничества и развития: Руководство ОЭСР по тестированию химических веществ. Руководство по тестированию 408. 90-дневное исследование оральной токсичности повторных доз на грызунах, Париж: OECD 1995.
- Национальный институт безопасности и гигиены труда: Руководство NIOSH по аналитическим методам, метод № 7300, 7604, Цинциннати: NIOSH, 1999, 395.
- Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW, Roszek B, Bisschops J, Gosens I, De Meent BR, Dekkers S, De Jong, Van Jijverden MV, Sips AJAM, Geertsma RE: Nano-серебро: обзор имеющихся данных и пробелов в знаниях по оценке рисков для человека и окружающей среды. *Нанотоксикология* 2009, 3:109-138.
- Furchner JE, Richmond CR, Drake GA: Сравнительный метаболизм радионуклиды у млекопитающих-IV. Задержка серебра — 110 м у мышей, крыс, обезьян и собак. *Health Phys* 1968, 15:505-514.
- Creasey M, Moffat DB: Отложение проглоченного серебра в почках крыс в разные возрасты. Опыт 1973, 29:326-327.
- Danscher G: световая и электронно-микроскопическая локализация серебра в биологических тканях. *Гистохимия* 1981, 71:177-186.
- Хэм К.Н., Танге Д.Д.: Отложение серебра в базальной мембране клубочков крыс. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1972, 50:423-434.
- Мoffat Д.Б., Кризи М.: Распределение проглоченного серебра в почках крысы и кролика. *Acta Anat* 1972, 83:346-355.
- Day WA, Hunt JS, McGiven AP: Отложение серебра в клубочках мышей. *Патология* 1976, 8:201-204.
- Jeong GN, Jo UB, Ryu HY, Kim YS, Song KS, Yu JI: Гистохимическое исследование кишечных муцинов после введения наночастиц серебра крысам Sprague Dawley. *Arch Toxicol* 2010, 84(1):63-9.
- KEMTI (Корейский институт тестирования окружающей среды и товаров): Субхроническая ингаляционная токсичность наночастиц золота. Отчет, представленный Корейскому управлению по контролю за продуктами и лекарствами, Сеул. Корея 2009.

doi:10.1186/1743-8977-7-20

Цитируйте эту статью как: Kim et al.: Субхроническая пероральная токсичность наночастиц серебра. *Токсикология частиц и волокон* 2010 7:20.

Отправьте свою следующую рукопись в BioMed Central и воспользуйтесь всеми преимуществами:

- Удобная онлайн-подача
 - Тщательная экспертная оценка
 - Никаких ограничений по площади или сборов за цветные рисунки
 - Немедленная публикация после принятия
- Включение в PubMed, CAS, Scopus и Google Scholar
- Исследование, которое свободно доступно для распространения

Отправьте свою рукопись на www.biomedcentral.com/submit

