

**М.А. Новиков¹, Е.А. Титов¹, В.А. Вокина¹, Н.Л. Якимова¹, Л.М. Соседова¹, С.А. Коржова²,
А.С. Поздняков², А.И. Емельянов², О.А. Пройдакова³, Т.Г. Ермакова², Г.Ф. Прозорова²**

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НОВОГО СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩЕГО ПОЛИМЕРНОГО НАНОКОМПОЗИТА

¹ *Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека (Ангарск)*

² *Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)*

³ *Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН (Иркутск)*

В материалах представлены результаты синтеза и биологического испытания нового нанокомпозита, содержащего наночастицы серебра, инкапсулированные в синтетический полимер – поли-1-винил-1,2,4-триазол. Показана методика синтеза водорастворимого серебросодержащего полимерного нанокомпозита. С использованием комплекса современных методов анализа установлено, что полученный нанокомпозит состоит из наночастиц серебра размерами 2–10 нм стабилизованных полимерной матрицей. Выявлено, что новый нанокомпозит вызывает незначительные изменения в структуре тканей внутренних органов экспериментальных животных и биохимические сдвиги, характерные для развития компенсаторно-приспособительных реакций. Представлены результаты распределения наночастиц серебра преимущественно в тканях почек и печени.

Ключевые слова: нанокомпозит, поли-1-винил-1,2,4-триазол, наносеребро, экспериментальные исследования, белые крысы, морфология тканей органов

BIOLOGICAL EFFECTS OF THE NEW SILVER-CONTAINING POLYMER NANOCOMPOSITE

**М.А. Novikov¹, Е.А. Titov¹, В.А. Vokina¹, Н.Л. Yakimova¹, Л.М. Sosedova¹, С.А. Korzhova²,
А.С. Pozdnyakov², А.И. Emelyanov², О.А. Proydakova³, Т.Г. Ermakova², Г.Ф. Prozorova²**

¹ *Institute of Occupational Health and Human Ecology ESSC HE SB RAMS, Angarsk*

² *A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk*

³ *Institute of Geochemistry SB RAS, Irkutsk*

In the materials there are presented results of the synthesis and biological testing of the new nanocomposite which contains silver nanoparticles encapsulated in the synthetic polymer poly-1-vinyl-1,2,4-triazole. The synthesis method of silver-containing polymers nanocomposite is shown. With the use of modern equipment evidence of the nanocomposite with the size of 2–10 nm silver production are substantiated. It was revealed that the new nanocomposite causes slight changes in the tissue structure of experimental animals internal organs and biochemical shift that is characteristic for the compensatory-adaptive reactions development. There are presented the results of the silver nanoparticles distribution mainly in the kidney and liver tissue.

Key words: nanocomposite, the polymer poly-1-vinyl-1,2,4-triazole, nanosilver, experimental studies, white rats, the morphology of organ tissues

С развитием нанотехнологии появилась возможность создавать материалы с заданными свойствами, манипулировать на уровне атомов и молекул [1]. Наноматериалы сегодня уже широко используются для диагностики и лечения: различные биосенсоры, биочипы, нанолюминофоры – для выявления структур и веществ, химических и инфекционных агентов, присутствующих в организме человека и окружающей среде, как устройства для детектирования определенных нуклеотидных последовательностей [3, 4]. Мировой объем продаж лекарств с модифицированной системой доставки с использованием наноматериалов в настоящее время составляет 20 % от общего объема рынка фармпрепаратов [1]. Высокоразвитая поверхность наночастиц, наличие на поверхности различных химических активных функциональных групп, углеводородных фрагментов и микропримесей металлов определяют их высокие сорбционные свойства к биомолекулам.

Одним из перспективных направлений исследований является изучение воздействия на орга-

низм наносеребра, так как применение серебра в виде наночастиц позволяет в сотни раз снизить концентрации серебра с сохранением всех бактерицидных свойств. Повышенный интерес проявляется к разработке препаратов, содержащих серебро вnanoформе, с использованием в качестве наностабилизирующих матриц природных и синтетических полимеров, синтезируемых в лабораторных условиях, являющихся перспективными для создания инновационных фармакологических препаратов антимикробного и противоопухолевого действия. В институте химии им. А.Е. Фаворского ИНЦ СО РАН разработаны трансмембранные нанокомпозиты, где в качестве мембранотранспортной матрицы использован синтетический полимер поли-1-винил-1,2,4-триазол (ПВТ) [2], а в качестве универсального антимикробного агента – инкапсулированные в эту полимерную матрицу наночастицы серебра. ПВТ является водорастворимым биосовместимым ($LD_{50} > 3000$ мг/кг) синтетическим гетероциклическим полимером, обладающим химической стойкостью, терми-

ческой стабильностью, проявляющим высокую способность стабилизировать частицы серебра в нульвалентном наноразмерном состоянии.

Цель исследования — синтез и экспериментальное испытание на лабораторных животных образцов нанокомпозита, состоящего из наночастиц серебра в матрице ПВТ (nano-Ag-ПВТ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Синтез нанокомпозита с наночастицами серебра в матрице ПВТ проходил следующим образом: к 2,0 г (21,0 ммоль) ПВТ в 36 мл воды добавляли 4 мл водного раствора, содержащего 0,17 г (1,0 ммоль) AgNO_3 , интенсивно перемешивали 40 мин при комнатной температуре, затем добавляли 0,04 г (1,0 ммоль) NaBH_4 и продолжали перемешивать при комнатной температуре в течение 12 ч. Композит подвергали дигидризации, выделяли переосаждением в смесь этанола и ацетона (1 : 2), высушивали в вакууме над CaCl_2 . Получали нанокомпозит в виде темно-коричневого порошка с содержанием серебра 7,0 %. Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрометре Perkin-Elmer Lambda 35. Элементный анализ проводили на анализаторе Flash 1112 Series EA. Рентгенографический анализ выполняли на порошковом дифрактометре D8 ADVANCE (Си-излучение). Микрофотографии образцов нанокомпозитов получали на просвечивающем электронном микроскопе Leo 906E.

Оценка биологических ответных реакций полученного нанокомпозита проводилась на 32 аутбредных белых крысах-самках массой 180–230 г, содержащихся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде и пище. Исследования проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986). Опытные и контрольные группы подбирались в соответствии с методическими рекомендациями «Оценка безопасности наноматериалов», утвержденных приказом № 280 от 12.10.2007 г. В соответствии с рекомендациями, кроме экспонирования продукции, содержащей наноматериалы, также исследуется продукция, полученная традиционным способом. Животным ($n = 8$) на протяжении 9 дней вводили внутрижелудочно через зонд водный раствор nano-Ag-ПВТ из расчета 100 мкг серебра на килограмм массы тела в объеме 1 мл на 100 г массы. Крысы из группы сравнения ($n = 8$) получали внутрижелудочно в эквивалентных количествах раствор ПВТ или водную дисперсию коллоидного серебра — колларгола с содержанием серебра 0,001 %, контрольные животные ($n = 8$) — дистиллированную воду. Животных декапитировали на следующий день после последнего введения испытуемых растворов. На светооптическом исследовательском микроскопе Olympus BX 51 исследовали структуру ткани коры головного мозга и ткани печени у контрольных и экспериментальных животных. Ввод микроизображений срезов мозга в компьютер проводили

при помощи камеры Olympus. Головной мозг и печень животных фиксировали в 10 % нейтральном формалине, с последующей проводкой и заливкой в парафин. Далее на санных микротомах МС-2 (СССР) и НМ 400 (Microm, Германия) с использованием одноразовых ножей изготавливали сагиттальные, фронтальные срезы головного мозга и печени. Приготовленные стандартные серийные срезы толщиной 3–5 мкм наклеивали на стекла, обработанные яичным альбумином. Для оценки состояния тканей и клеток коры головного мозга и печени препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Для изучения распределения серебра по внутренним органам (печень, почки, головной мозг) в Институте геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН проведена оценка содержания серебра в исследуемых образцах при помощи атомно-абсорбционного спектрометра Perkin Elmer модель 503 с электрометрическим атомизатором НГА-72. Дополнительно определяли относительную и абсолютную массу внутренних органов (печени, почек, селезенки) и головного мозга, количество восстановленного глутатиона (SH), активность каталазы, пероксидазы и малонового диальдегида (МДА) в крови контрольных и экспериментальных животных. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0» (Statsoft, США). Статистическую значимость различий в независимых выборках определяли по методике Манна — Уитни. Достигнутый уровень значимости признаков — при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез нанокомпозита проводили методом восстановления ионов серебра из нитрата серебра боргидридом натрия в водной среде в присутствии ПВТ. Реакция протекает с образованием окрашенных золей, из которых выделяют нанокомпозит в виде порошка темно-коричневого цвета с содержанием серебра 7,0 %, хорошо растворимый в воде. В электронных спектрах нанокомпозита появляется полоса плазмонного поглощения (с максимумом 412 нм), характерная для серебра в наноразмерном нульвалентном состоянии (рис. 1). На рентгеноискательном дифрактометре нанокомпозита (рис. 2) четко дифференцируются аморфное гало полимерной матрицы и интенсивные рефлексы нульвалентного металлического серебра, идентифицированного путем сопоставления значений полученных межплоскостных расстояний и относительных интенсивностей с эталонными для металлического серебра.

Согласно результатам просвечивающей электронной микроскопии, наночастицы серебра равномерно распределены в матрице полимера и имеют размеры 2–10 нм (рис. 3).

Для установления эффективности проникновения наночастиц серебра в различные органы экспериментальных крыс определяли содержание серебра в печени, почках и мозге. Исследовали

органы животных, получивших исходную полимерную матрицу — поли-1-винил-1,2,4-триазол (ПВТ), нанокомпозит с наночастицами серебра в этой матрице (Н-Аг-ПВТ), колларгол и дистиллированную воду. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Установлено, что наночастицы серебра размерами 2–10 нм активно проникают в такие органы, как печень, почки и в меньшей степени в мозг.

По результатам гистологических исследований в ткани коры головного мозга при воздействии нано-Аг-ПВТ отмечался выраженный периваску-

лярный отек сосудов головного мозга (рис. 4), а также набухание проводящих волокон в подкорковых структурах (рис. 5), что может быть связано с транзиторными метаболическими нарушениями в нервной ткани при проникновении чужеродного агента через гематоэнцефалический барьер. В печени при воздействии нано-Аг-ПВТ наблюдался стаз сосудов, мелкоочаговый некроз (рис. 6). Также в синусоидах были обнаружены звездчатые ретикулоэндотелиоциты (клетки Купфера), которые являются мононуклеарными макрофагами, обычно встречающиеся при нарушении функции ткани.

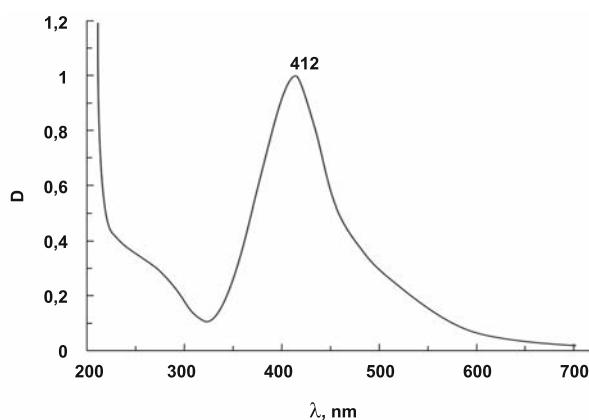


Рис. 1. Ультрафиолетовый спектр поглощения водного раствора нанокомпозита, состоящего из наночастиц серебра в матрице поли-1-винил-1,2,4-триазола.

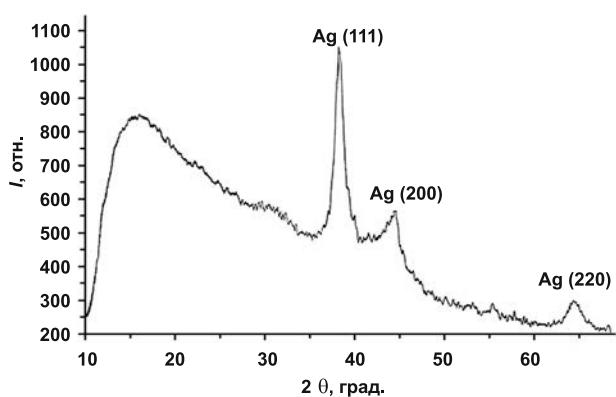


Рис. 2. Дифрактограмма нанокомпозита, состоящего из наночастиц серебра в матрице поли-1-винил-1,2,4-триазола.

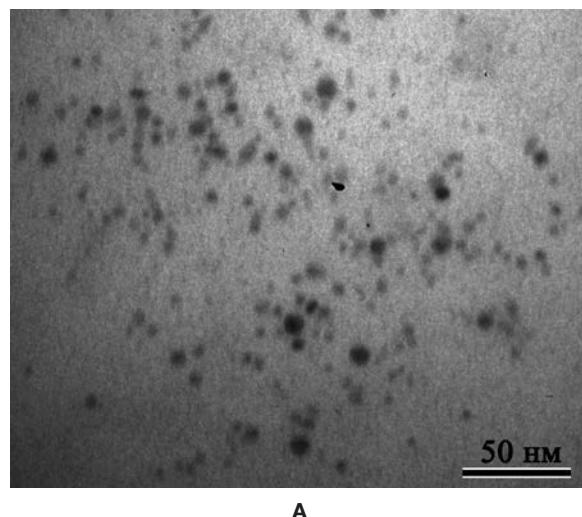
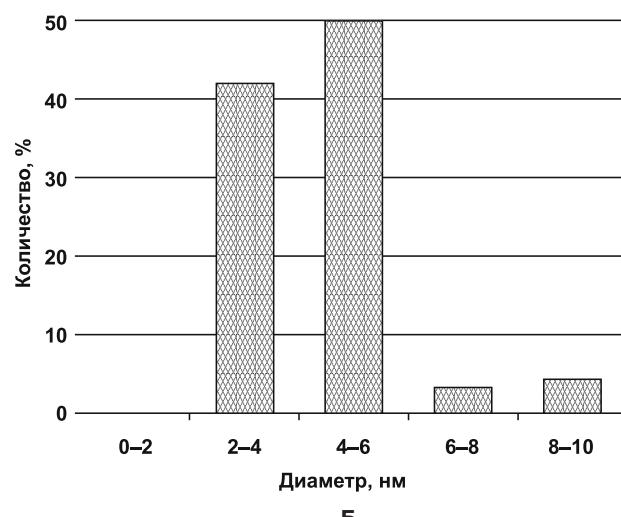


Рис. 3. Микрофотография нанокомпозита, состоящего из наночастиц серебра в матрице поли-1-винил-1,2,4-триазола (А) и диаграмма распределения наночастиц серебра по размерам (Б).



Результаты исследования содержания серебра в образцах биоты

Таблица 1

Образец	Содержание серебра в органах крыс, мкг/кг		
	печень	почки	мозг
Контроль (дистиллированная вода)	0	0	0
Поли-1-винил-1,2,4-триазол (+дистиллированная вода)	0	0	0
Нанокомпозит, состоящий из наночастиц серебра в матрице поли-1-винил-1,2,4-триазола (доза 100 мкг/кг)	0,14	0,19	0,05
Колларгол	0,33	0,09	0,07

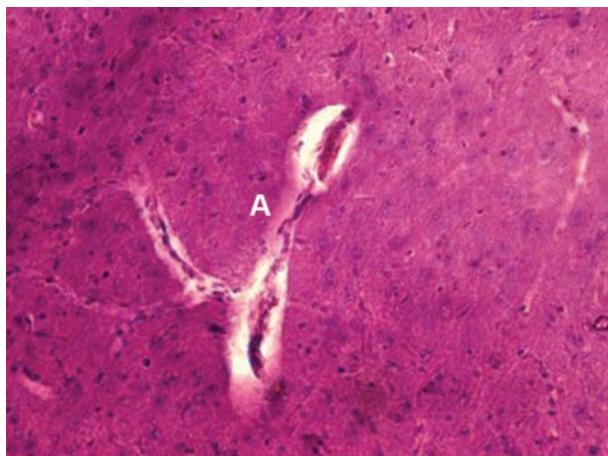


Рис. 4. Нанокомпозит, состоящий из наночастиц серебра в матрице поли-1-винил-1,2,4-триазола. Мозг. Периваскулярный отек сосудов головного мозга (**А**). Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 400$.

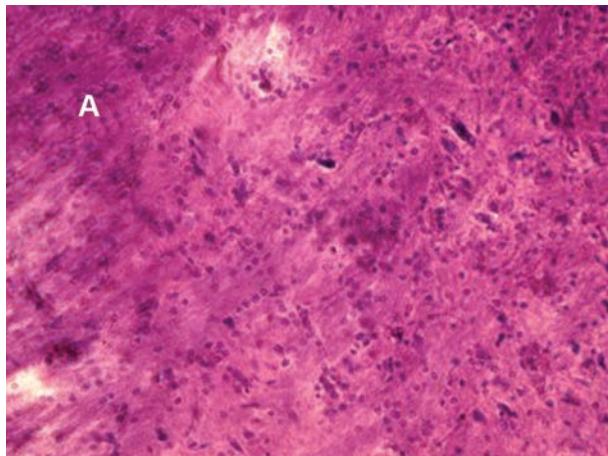


Рис. 5. Нанокомпозит, состоящий из наночастиц серебра в матрице поли-1-винил-1,2,4-триазола. Мозг. Незначительное набухание проводящих волокон (**А**). Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 400$.

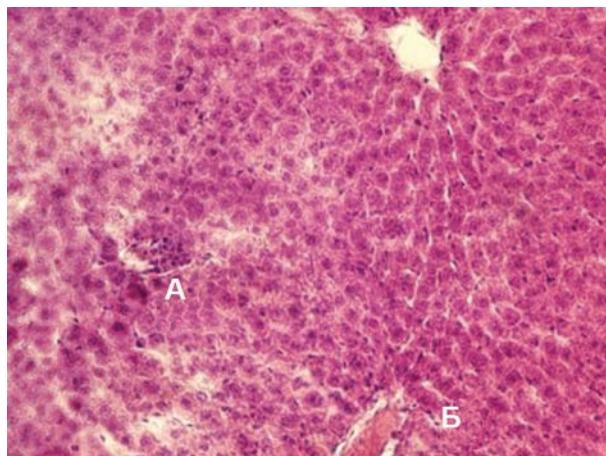


Рис. 6. Нанокомпозит, состоящий из наночастиц серебра в матрице поли-1-винил-1,2,4-триазола. Печень. Мелкоочаговый некроз (**А**), стаз сосудов (**Б**). Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 400$.

Введение животным ПВТ без наночастиц серебра повлияло на изучаемые органы незначительно: в тканях коры головного мозга наблюдался стаз сосудов, что по нашему мнению, может быть результатом адгезии форменных элементов крови к ПВТ.

В клетках печени также наблюдалась стаз сосудов, наличие расширенных синусоид и клеток Купфера в синусоидах. При воздействии колларгола и у контрольных животных, получивших дистиллированную воду, каких-либо изменений в структуре тканей не наблюдалось.

По результатам исследований интегральных показателей, динамика прироста массы тела животных не различалась в течение всего эксперимента. Введение ПВТ вызывало достоверное увеличение активности катализы и повышение уровня восстановленного глутатиона в крови по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать

Таблица 2
Биохимические и интегральные показатели белых крыс через 9 суток после внутрижелудочного введения испытуемых препаратов

Изучаемые показатели	Группы животных			
	Нанокомпозит состоящий из наночастиц серебра в матрице поли-1-винил-1,2,4-триазола ($n = 8$)	Поли-1-винил-1,2,4-триазол ($n = 8$)	Колларгол ($n = 8$)	Контроль ($n = 8$)
Масса тела до опыта, г	203,75 \pm 25,31	206,25 \pm 25,46	204,38 \pm 29,69	207,50 \pm 22,04
Масса тела после опыта, г	211,25 \pm 32,04	211,88 \pm 30,47	207,5 \pm 31,39	210,63 \pm 24,27
Восстановленный глутатион в крови, мкмоль/мл	0,74 \pm 0,11	0,84 \pm 0,09 [#]	0,66 \pm 0,07	0,65 \pm 0,04
Малоновый диальдегид в крови, мкмоль/мл	1,38 \pm 0,41	1,33 \pm 0,64	1,21 \pm 0,19	1,26 \pm 0,23
Каталаза, Е/мл мин	8,93 \pm 2,19	10,43 \pm 1,93 [#]	8,95 \pm 2,22	8,29 \pm 1,83
Пероксидаза, мкмоль/мл мин	196,99 \pm 47,48	195,92 \pm 56,27	228,13 \pm 37,08	232,70 \pm 39,96
Абс. масса печени, г	6,75 \pm 1,06	6,68 \pm 1,29	6,51 \pm 1,01	7,38 \pm 1,06
Абс. масса почек, г	1,36 \pm 0,16	1,31 \pm 0,21	1,31 \pm 0,2	1,4 \pm 0,13
Абс. масса селезенки, г	0,73 \pm 0,22	0,98 \pm 0,47	0,75 \pm 0,21	0,78 \pm 0,18
Абс. масса головного мозга, г	1,8 \pm 0,09	1,83 \pm 0,09	1,83 \pm 0,12	1,83 \pm 0,09
Отн. масса печени, г	3,22 \pm 0,47	3,14 \pm 0,33 [#]	3,14 \pm 0,21 [#]	3,49 \pm 0,22
Отн. масса почек, г	0,64 \pm 0,04	0,62 \pm 0,05 [#]	0,63 \pm 0,04	0,67 \pm 0,04
Отн. масса селезенки, г	0,34 \pm 0,09	0,47 \pm 0,24	0,37 \pm 0,13	0,37 \pm 0,07
Отн. масса головного мозга, г	0,87 \pm 0,11	0,87 \pm 0,09	0,89 \pm 0,09	0,87 \pm 0,08

Примечание: * – различия значимы по отношению к группе, получавшей колларгол, $p < 0,05$; # – различия значимы по отношению к контрольной группе, $p < 0,05$.

вать об активации естественной антиоксидантной защиты на введение чужеродного агента.

У животных, получавших нано-Ag-ПВТ, не установлено статистически значимых различий по всем изучаемым показателям как по отношению к группе белых крыс с воздействием ПВТ, так и в сравнении с контрольными особями, что отражено в таблице 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, морфологическое исследование внутренних органов лабораторных животных, подвергшихся воздействию нового серебросодержащего полимерного нанокомпозита, выявило незначительные изменения, обычно сопровождающие метаболические сдвиги в структуре клеток и тканей. Вероятно, это связано с развитием компенсаторно-приспособительных реакций, возникающих в ответ на введение чужеродного агента и характерно для перестройки функционального состояния организма на новый устойчивый уровень. Биохимические исследования показали, что введение полимерной матрицы ПВТ вызывало достоверное повышение активности каталазы и повышение уровня восстановленного глутатиона в крови по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать об активации есте-

ственной антиоксидантной защиты на введение чужеродного агента. Установлено, что серебро в наноформе, инкапсулированное в матрицу поли-1-винил-1,2,4-триазола, проникает во внутренние органы экспериментальных животных, накапливаясь, преимущественно, в тканях почек и печени. В дальнейших экспериментальных исследованиях предполагается установить длительность сохранения возникших морфологических изменений во внутренних органах и время выведения серебра в наноформе из тканей организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию. — М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007. — С. 34–40.
2. Прозорова Г.Ф., Коржова С.А., Конькова Т.В., Ермакова Т.Г. и др. Особенности формирования наночастиц серебра в полимерной матрице // ДАН. — 2011. — Т. 437, № 1. — С. 50–52.
3. Kagan V.E., Bayir H., Shvedova A.A. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin // Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine. — 2005. — Vol. 1. — P. 313–316.
4. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles // Environmental Health Perspectives. — 2005. — N 7 (13). — P. 823–839.

Сведения об авторах

- Новиков Михаил Александрович** – аспирант лаборатории токсикологии Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН (665827, г. Ангарск, 12-А мкр., 3; тел.: 8 (3955) 554-079; e-mail: novik-imt@mail.ru)
- Титов Евгений Алексеевич** – младший научный сотрудник лаборатории токсикологии Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН (тел.: (3955) 554-079; e-mail: g57097@yandex.ru)
- Вокина Вера Александровна** – младший научный сотрудник лаборатории токсикологии Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН (тел.: (3955) 554-079; e-mail: wokina@mail.ru)
- Якимова Наталья Леонидовна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории токсикологии Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН (тел.: (3955) 554-079; e-mail: ynl-77@list.ru)
- Соседова Лариса Михайловна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией токсикологии Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН (тел.: (3955) 55-40-79; e-mail: imt@irmail.ru)
- Коржова Светлана Анатольевна** – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории функциональных синтетических и природных полимеров Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (тел.: (3952) 51-14-31; e-mail: korzhova@irioch.irk.ru)
- Поздняков Александр Сергеевич** – младший научный сотрудник лаборатории функциональных синтетических и природных полимеров Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (тел.: (3952) 51-14-31; e-mail: pozdnyakov@irioch.irk.ru)
- Емельянов Артем Иванович** – аспирант лаборатории функциональных синтетических и природных полимеров Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (тел.: (3952) 511-431; e-mail: emelyanov@irioch.irk.ru)
- Пройдакова Ольга Анатольевна** – кандидат химических наук, ведущий инженер химико-аналитической лаборатории Института геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН (тел.: (3952) 51-14-70; e-mail: proyd@igc.irk.ru)
- Ермакова Тамара Георгиевна** – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории функциональных синтетических и природных полимеров Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (тел.: (3952) 511-431; e-mail: ermakova@irioch.irk.ru)
- Прозорова Галина Фирсовна** – доктор химических наук, заведующая лабораторией функциональных синтетических и природных полимеров Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (тел.: (3952) 511-431; e-mail: prozorova@irioch.irk.ru)