

STRUCTURAL EFFECTS OF ACTION NANOSILVER ON LUNG OF RATS AT CONDITIONS INTRATRACHEAL INSTILLATION

Yavorovsky O.P., Zinchenko T.O., Kolesova N.A., Shkurko G.A., Litvinenko V.I., Sukhareva N.M.

СТРУКТУРНІ ЕФЕКТИ ДІЇ НАНОСРІБЛА НА ЛЕГЕНІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНТРАТРАХЕАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ



**ЯВОРОВСЬКИЙ О.П.,
ЗІНЧЕНКО Т.О.,
КОЛЕСОВА Н.А., ШКУРКО Г.А.,
ЛИТВИНЕНКО В.І.,
СУХАРЄВА Н.М.**

Національний медичний
університет

ім. О.О. Богомольця,
м. Київ,
e-mail:

zinchenko.tanja@gmail.com
УДК 613.6:616-018:546.57

Ключові слова:
**наночастинки срібла,
легені, структурні зміни,
токсикологія.**

станніми роками швидкими темпами розвиваються нові технології та методи, що базуються на принципах самоорганізації. Інтерес до нанотехнологій пояснюється тим, що матеріали у наноструктурному стані мають абсолютно унікальні фізико-хімічні властивості, такі як значна питома поверхня, підвищена реакційна та каталітична здатність, адсорбційний потенціал тощо [1]. Нанорозмірне срібло має значну потенціальну антимікробну активність щодо багатьох патогенних організмів і завдяки цьому широко застосовується у легкій промисловості та медицині [4, 5]. Наносрібло являє собою частинки металевого срібла розміром від 1 до 100 нм в одному чи декількох вимірах (наночастинка срібла розміром 9 нм містить близько 24000 атомів срібла) [6]. Дані літератури свідчать, що нано-Аг значно токсичніше, ніж його аналог у макроскопічній дис-

персії. Цей феномен пояснюють здатністю наночастинок безперешкодно долати біологічні бар'єри організму, викликати окислювальний стрес, внаслідок цього — апоптоз клітин [3, 10]. Дослідження токсичності наночастинок срібла на ембріонах Смугастого Даніо виявило зростання частоти загибелі ембріонів, виникнення серцевих та інших вроджених вад [6, 7]. Внаслідок субхронічного впливу нано-Аг на ссавців спостерігали розвиток периваскулярного набряку у верхніх відділах легень та альвеоліту [8]. Дослідження легеневого та системного розподілу ультрадрібних частинок срібла показало, що їхні розмір та тенденція до створення агломератів впливають на шляхи їх розподілу у легенях. В альвеолах дрібні частинки легко фагоцитуються альвеолярними макрофагами. Агломеровані частинки мікроскопічно помітні у стінках альвеол [9].

Проведені нами гігієнічні дослідження умов праці операторів при одержанні наночастинок срібла за допомогою електронно-променевої технології показали, що специфічним і потенційно небезпечним чинником для даного виробництва є аерозоль матричного натрію хлориду, який містить власне наночастинки срібла (до 30%). Під час різних технологічних операцій концентрація аерозолу коливається від 0,006 до 2,06 мг/м³. 98% матричного пилу належать до респірабельної фракції. У літературі практично відсутні дані щодо структурних змін у легенях внаслідок впливу нано-Аг, тому всебічне еколого-токсикологічне дослідження цього нового антропогенного чинника є досить актуальним.

Метою нашого дослідження було вивчення динаміки розвитку патоморфологічних змін

СТРУКТУРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ НАНОСЕРЕБРА НА ЛЕГКИЕ КРЫС ПРИ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

Яворовский А.П., Зинченко Т.О., Колесова Н.А., Шкурко Г.А., Литвиненко В.И., Сухарева Н.М.

Поскольку существует реальная возможность поступления в организм определенного количества наночастиц серебра ингаляционным путем, нами было проведено гистологическое исследование легких. Целью данного эксперимента было изучение динамики развития патоморфологических изменений в легочной ткани в разные сроки наблюдения при интратрахеальном введении наносеребра в матрице NaCl. Обнаружили накопление инстиллированного материала в макрофагах интерстиция межальвеолярных перегородок и в апикальных частях реснитчатого эпителия бронхов с постепенным уменьшением его количества в динамике эксперимента. Введение наносеребра приводило к развитию в легких острого и хронического пневмонита, хронического катарального бронхита, очагов эмфизематозных и склеротических изменений, которые усиливались с увеличением сроков наблюдения. Через 12 месяцев в легких определялись также морфологические признаки развития легочной гипертензии.

Ключевые слова: наночастицы серебра, легкие, структурные изменения, токсикология.

© Яворовський О.П., Зінченко Т.О., Колесова Н.А., Шкурко Г.А., Литвиненко В.І., Сухарєва Н.М. СТАТТЯ, 2011.

у легеневій тканині у різні строки експерименту за умов інтратрахеального введення наночастинок срібла до матриць NaCl.

Матеріали та методи. Досліді проводили на 40 щурах-самцях лінії Wistar вагою 240-260 грамів. У дослідженні використовували наночастинок срібла у матриці NaCl, одержані методом електронно-променевого випаровування у вакуумі у лабораторії № 84 Міжнародного центру електронно-променевих технологій Інституту електрозварювання ім. Є.О. Патона. З використанням електронної мікроскопії за розробленою нами методикою [2] встановлено, що частинки срібла мають переважно сферичну форму розміром 28-30 нм. Наночастинок срібла вводили тваринам інтратрахеально у кількості 50 мг матеріалу на 0,5 мл дистилляту одноразово. Забір зразків тканин проводили через 1, 3, 7 днів, 6 і 12 місяців.

Для гістологічного дослідження легені фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. Після фіксації матеріал зневоднювали у спиртах висхідної концентрації, проводили через спирт-хлороформ, хлороформ, заливали у парафін. На санному мікротомі готували зрізи завтовшки 7 мкм, які забарвлювали гематоксиліном і еозином та за ван-Гізон. Гістоморфометричне дослідження здійснювали за допомогою цитоморфологічного комплексу "Olympus"-Cх 31 і цифрової ві-

деокамери "Olympus"-C 5050 ZOOM з об'єктивами мікроскопа Plan 4 x 0,10, 10 x /0,25 і Plan 40 x /0,65.

Результати та їх обговорення. Мікроскопічне дослідження легень за добу після інтратрахеального введення наночастинок срібла до матриці NaCl виявило наявність інсталюваного матеріалу у відділах легень. Найбільше накопичення матеріалу було встановлено у макрофагах міжальвеолярних перетинок у вигляді дрібних і більш крупних скупчень чорного кольору (рис.1). Чорний матеріал також мозаїчно виявлявся у бронхах крупного, середнього та дрібного діаметрів і розташовувався в апікальних частинах вільчастого епітелію та у пристіночному слизі. Просвіти частини бронхів були вільними від інсталюваного матеріалу. У просвітах дрібних бронхів та альвеол нано-Ag у матриці NaCl виявлялося рідко. У місцях його накопичення міжальвеолярні перетинки потовщені, інфільтровані переважно лімфоїдними елементами з домішками плазматичних клітин, тканинних базофілів, макрофагів та поодиноких нейтрофільних гранулоцитів. Інтерстиціальна тканина та кровоносні судини усіх калібрів не мали суттєвих патологічних змін, були помірно кровонаповнені. У просвітах кровоносних судин інсталюваного матеріалу не виявлено.

У легенях тварин контрольних груп (контроль віварію та інтратрахеального введення

розчину NaCl) такі патологічні зміни відсутні.

За 3 доби після інтратрахеального введення наночастинок срібла інстильований матеріал виявлявся у макрофагальних елементах потовщених міжальвеолярних перетинок у вигляді дрібних включень та конгломератів. У кількісному відношенні відзначалося його зменшення на 25-30%. У місцях локалізації чорних включень міжальвеолярні перетинки зазвичай були потовщеними та інфільтрованими переважно лімфо-плазмоцитарними елементами. У частині бронхів усіх калібрів виявлялися ознаки розвитку хронічного бронхіту з потовщенням, набряком та інфільтрацією усіх шарів стінок, а також з дистрофічними змінами та частковою десквамацією епітелію (рис. 2). Інстильований матеріал в епітелії та просвітах бронхів визначався у великій кількості. Разом зі структурними ознаками початку розвитку хронічного запалення у бронхіальному дереві та у респіраторному відділі у легенях виявлялися ділянки зі звичайною будовою.

У 1/3 піддослідних тварин цієї групи у легенях розвивалися ознаки локального гострого запального процесу з потовщенням, набряком та інфільтрацією нейтрофільними гранулоцитами і лімфоїдними елементами міжальвеолярних перетинок, а також з наявністю серозного ексудату у просвітах альвеол.

Рисунок 1

Легені щура за 1 добу після інтратрахеального введення наносрібла. Інстильований матеріал у макрофагах потовщених міжальвеолярних перетинок. Фарбування гематоксиліном і еозином. Зб.: об. 10, ок. 10.

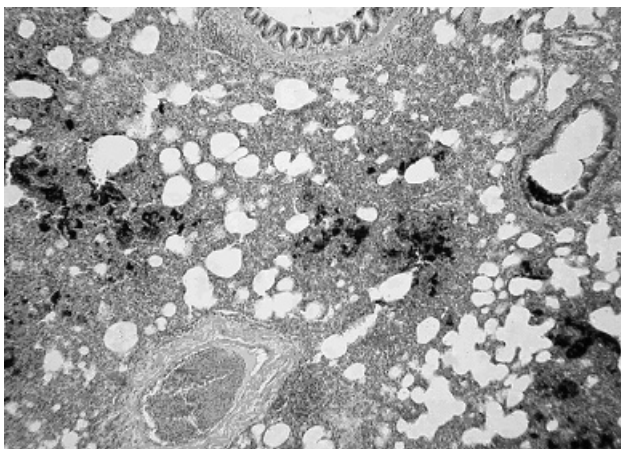
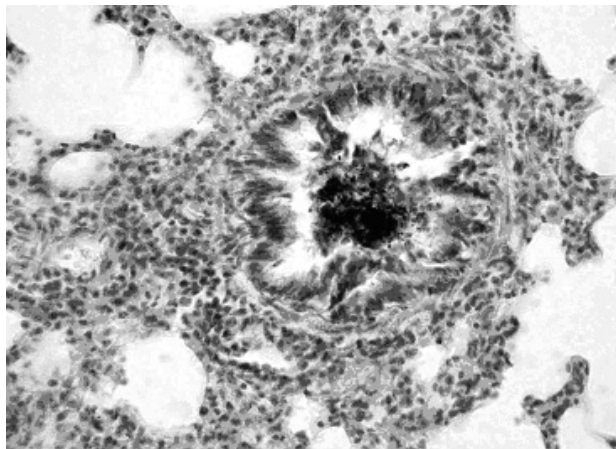


Рисунок 2

Легені щура за 3 доби після інтратрахеального введення наносрібла. Потовщення та інфільтрація стінок бронху малого калібру з вогнецево десквамованим епітелієм та інстильованим матеріалом у просвіті. Фарбування гематоксиліном і еозином. Зб.: об. 40, ок. 10.



Продовження терміну спостереження над експериментальними тваринами після інтратрахеального введення наносрібла до 7 днів обумовлювало зменшення у легенях кількості інстальованого матеріалу до 10-20% від того, який виявлявся мікроскопічно за добу.

Разом з тим, у легенях збільшувалися ділянки з мікроскопічними ознаками гострого запального процесу, за якого у просвітах альвеол накопичувався ексудат. У більшості полів зору виявлялася гетерогенність ушкодження легень: поля гострого пневмоніту чергувалися з ділянками хронічного пневмоніту, хронічного бронхіту, а також дрібними вогнищами емфізематозних змін (рис. 3).

За 6 місяців після одноразового інтратрахеального введення наносрібла мікроскопічні зміни у легенях мали інший характер: переважали потоншення та розриви міжальвеолярних перетинок з редукцією капілярного русла та нерівномірним збільшенням площі альвеол, що відображає розвиток у легенях централобулярної емфіземи. Привертає увагу також потовщення стінок артеріальних судин системи легеневої артерії, що може відображати морфологічні ознаки розвитку легеневої гіпертензії (рис. 4).

Зрідка у полі зору мікроскопу зустрічалися залишки інстальованих матеріалів (агломератів), які локалізувалися переважно у макрофагальних еле-

ментах інтерстиція легень.

Подовження строку експерименту до 12 місяців призводило до розвитку у легенях вогнищевих ознак пневмосклерозу (рис. 5). Колагенові волокна виявляються на місцях розташування агломератів наносрібла, а також периваскулярно та перибронхіально. Вогнища емфіземи чергувалися з вогнищами хронічного пневмоніту, хронічного бронхіту та пневмосклерозу.

Значних змін зазнавали також судини системи легеневої артерії, у т.ч. дрібні її гілки та артеріоли, в яких відзначено потовщення стінок за рахунок гіпертрофії м'язового шару та облітерації просвіту. Такі зміни у легенях у комплексі можуть служити підґрунтям до розвитку в організмі піддослідних тварин, яким інстальували внутрішньотрахеально наносрібло, легеневої гіпертензії.

Обговорюючи експериментальні дані щодо впливу наночастинок срібла, одержаних за

допомогою електронно-променевої технології, в експерименті на лабораторних тваринах за різних термінів спостереження (1 доба — 12 місяців), можна констатувати, що вони мають свої особливості. Так, дані авторів Sung J.H., Takenaka S. et al. стосуються лише короткотривалих або середньотривалих термінів дії частинок наносрібла розміром 6-100 нм, причому основні морфологічні зміни виявлялися периваскулярним набряком у верхніх відділах легень та альвеолітом.

Досліджені нами наночастинки срібла виявили біологічну активність як у ранній період, так і за довготривалого спостереження. Якщо в умовах дії протягом 1-7 днів переважали запальні процеси, які супроводжувалися накопиченням конгломератів наносрібла у матриці NaCl у макрофагах між альвеолярними перетинками, то у більш пізніх термінах запальні процеси змінювалися розвитком емфіземи і пневмосклерозу.



ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Рисунок 3

Легені щура за 7 днів після інтратрахеального введення наносрібла. Гетерогенність ушкодження легень: чергування ділянок гострого і хронічного запалення та вогнищевої емфіземи; інстальований матеріал у макрофагах інтерстиція. Фарбування гематоксилином і еозином. Зб.: об. 10, ок. 10.

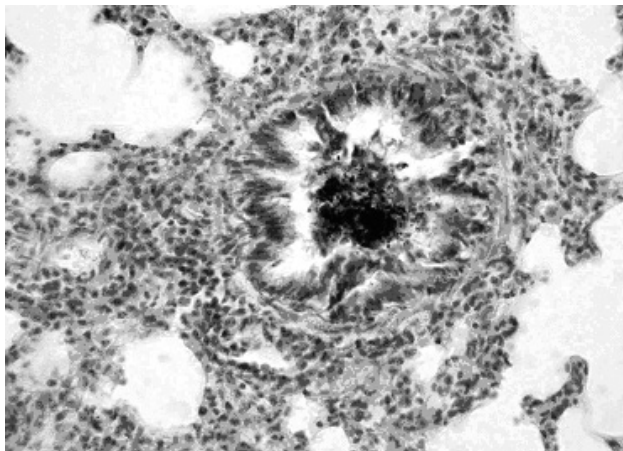
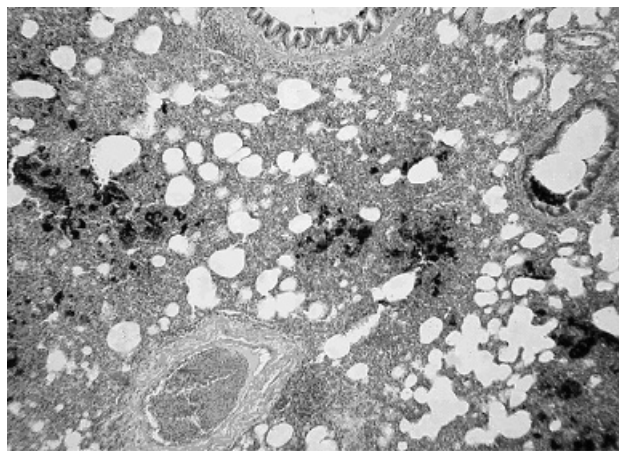


Рисунок 4

Легені щура за 6 місяців після інтратрахеального введення наносрібла. Потовщення стінок судин системи легеневої артерії. Емфізематозні зміни. Фарбування гематоксилином і еозином. Зб.: об. 20, ок. 10.



STRUCTURAL EFFECTS OF ACTION NANOSILVER ON LUNG OF RATS AT CONDITIONS INTRATRACHEAL INSTILLATION

Yavorovsky O.P., Zinchenko T.O., Kolesova N.A., Shkurko G.A., Litvinenko V.I., Sukhareva N.M.

We used a histological examination of lungs because that silver nanoparticles can enter into the organism through inhalation. The aim of this experiment was to investigate dynamics pathological changes in lung tissue at different observational periods after intratracheal administration of nanosilver in the matrix r NaCl. The injected material

has been found in macrophages of interalveolar septa and the interstitium of bronchial ciliated epithelium. Its amount gradually decreased in the dynamics of the experiment. The nanosilver led to the development acute and chronic pneumonitis, chronic catarrhal bronchitis, emphysematous lesions and sclerotic changes, which are amplified with increasing time of observation. The morphological signs of pulmonary hypertension in the lung were identified after 12 months

Key words: silver nanoparticles, lung, structural changes, toxicology.

Висновки

1. У легенях щурів після одноразового інтратрахеального введення наносрібла у матриці NaCl розвиваються структурні зміни у респіраторному відділі та у бронхіальному дереві, характер яких змінюється у динаміці експерименту.

2. На ранніх термінах досліджень наночастинки срібла накопичуються у макрофагах інтерстицію міжальвеолярних перетинок, меншою мірою — в апікальних частинах цитоплазми вільчастого епітелію бронхів усіх калібрів та у пристіночному слизі з поступовим зменшенням його кількості у динаміці спостереження. Інтратрахеальне введення наносрібла призводить також до розвитку у легенях гострого і хронічного пневмоніту, хронічного катарального бронхіту.

3. З подовженням строків експерименту у легенях спостерігається посилення розвитку емфізематозних та

склеротичних змін, а також визначаються морфологічні ознаки розвитку легеневої гіпертензії, про що свідчать зміни структури гілок легеневої артерії і артеріол.

4. Проведені експериментальні дослідження свідчать про високу біологічну активність нано-Ag, одержаного за допомогою електронно-променевої технології, про необхідність їх подальшого токсикологічного дослідження і гігієнічного нормування.

ЛІТЕРАТУРА

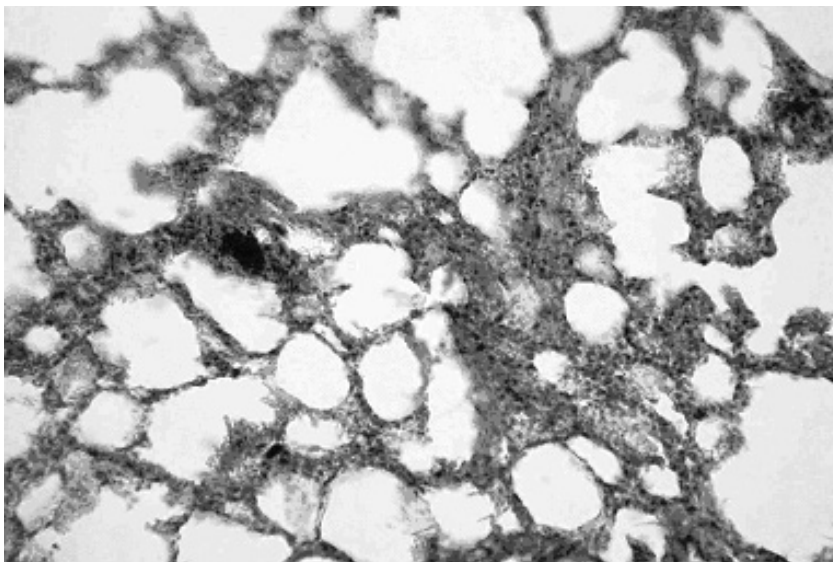
1. Балоян Б.М., Колмаков А.Г., Алымов М.И., Кротов. А.М. Наноматериали: классификации, особенности свойств, применение и технологии получения: учеб. пособие / [Б.М. Балоян, А.Г. Колмаков, М.И. Алымов, А.М. Кротов] — М.: АгроПресс-Дизайн, 2007. — 102 с.

2. Патент на корисну модель МПК (2009) G01N 33/48. Спосіб визначення у повітрі наночастинок срібла / О.П. Яворовський,

Рисунок 5

Легені щура за 1 рік після інтратрахеального введення наносрібла. Фіброз міжальвеолярних перетинок; залишки інстальованого матеріалу оточені колагеновими волокнами. Фарбування за ван-Гізон.

Зб.: об. 20, ок. 10.



В.П. Ширококов, В.В. Бобир, Т.О. Зінченко, М.В. Вертеленко // Заявл. 29.04.2009; опубл. 25.06.2009, Бюл. № 12. — 6 с.

3. Ahamed M., Posgai R., Gorey T.J., Nielsen M., Hussain S.M., Rowe J.J. (2010). Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster* // *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242 (3): 263-9.

4. Baker C., Pradhan A., Pakstis L. et al. (2005). Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles // *J. Nanosci Nanotechnol.* — 5 (2): 244-9.

5. Chen X., Schluesener H.J. (January 2008). Nanosilver: A nanoparticle in medical application // *Toxicology Letters.* — 176 (1): 1-12.

6. Kristen M. Kulinowski. Environmental Impacts of Nanosilver. [Електронний ресурс] // International Council on Nanotechnology. — 2008. — Режим доступу: http://icon.rice.edu/resources.cfm?doc_id=12722.

7. Robert J. Griffith, Kelly Hyn-dman, Nancy D. Denslow and Davis S. Barber. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles // *Toxicological Sciences.* — 2009. — 107 (2): 404-415.

8. Sung J.H., Ji J.H., Park J.D. et al. (2009). Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles // *Toxicol. Sci.* — 108 (2): 452-461.

9. Takenaka S., Karg E., Roth C. et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats // *Environ. Health Perspect.* — 2001. — 109: 547-51.

10. Carlson C., Hussain S., Schrand A., Braydich-Stolle L., Hess K., Rochelle J., Schlager J. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species // *J. Phys. Chem. B.* — 2008. — 112.

Надійшла до редакції 15.08.2011.