

УДК 541.182.642:546.57:612.[647+664].621.039.85

# Перенос наночастиц серебра через плаценту и молоко матери в эксперименте на крысах *in vivo*

Е. А. Мельник<sup>1</sup>, Ю. П. Бузулуков<sup>2</sup>, В. Ф. Демин<sup>2</sup>, И. В. Гмошинский<sup>1\*</sup>, Н. В. Тышко<sup>1</sup>, В. А. Тутельян<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт питания РАМН, 109240, Москва, Устьинский пр-д, 2/14

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

\*E-mail: gmosh@ion.ru

Поступила в редакцию 18.12.2012

**РЕФЕРАТ** Наночастицы (НЧ) серебра, широко используемые при производстве различных видов потребительской продукции и в медицине, относятся к новым видам материалов, создающих потенциальные риски для здоровья человека. Возможные негативные эффекты воздействия этих НЧ на репродуктивную сферу изучены недостаточно. В эксперименте *in vivo* проведена количественная оценка переноса наночастиц металлического серебра через плаценту и с молоком матери. Использовали НЧ серебра размером  $34.9 \pm 14.8$  нм, стабилизированные низкомолекулярным поливинилпирролидоном, которые метили радиоактивным изотопом  $^{110m}\text{Ag}$  путем облучения потока тепловых нейтронов в ядерном реакторе. Препараты [ $^{110m}\text{Ag}$ ]-НЧ вводили внутривенно через зонд беременным (20-й день беременности) или лактирующим (14–16-й дни лактации) самкам крыс в дозе 1.69–2.21 мг/кг массы тела в расчете на серебро. Накопление НЧ в плодах крыс и в крысятах, потреблявших материнское молоко, определяли с помощью низкофонового полупроводникового гамма-спектрометра через 24 и 48 ч после введения метки соответственно. Во всех случаях обнаружено проникновение метки [ $^{110m}\text{Ag}$ ]-НЧ через плаценту и ее поступление в материнское молоко в количестве, в 100–1000 раз превышающем чувствительность использованного аналитического метода. Средний уровень накопления НЧ в плодах составлял 0.085–0.147% от введенной дозы, что было сопоставимо с аккумуляцией метки в печени, крови и мышечном каркасе взрослых животных, и, как минимум, в 10–100 раз превосходил проникновение НЧ через гематоэнцефалический барьер в головной мозг самок. У лактирующих самок суммарное поступление [ $^{110m}\text{Ag}$ ]-НЧ в молоко составляло не менее  $1.94 \pm 0.29\%$  от введенной дозы за 48 ч лактации; не менее 25% этого количества всасывалось в пищеварительном тракте крысят. Таким образом, впервые получены экспериментальные доказательства переноса НЧ от матери к потомству через плаценту и с грудным молоком.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** беременность, лактация, наночастицы, радиоактивный индикатор, серебро, фетоплацентарный барьер.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БАД – биологически активная добавка; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; МР – методические рекомендации; МДА – минимальная детектируемая активность; НЧ – наночастицы; НМ – наноматериалы; ПВП – поливинилпирролидон; М – выборочное среднее; *m* – стандартная ошибка среднего.

## ВВЕДЕНИЕ

Прогрессивное развитие нанотехнологий и увеличение объемов выпуска и практического применения искусственных наночастиц (НЧ) и наноматериалов (НМ) привели к тому, что в ближайшее время НЧ могут стать значимыми контаминантами окружающей среды. Из числа приоритетных НМ особое внимание привлекают НЧ серебра, широко применяемые в различных видах потребительской продукции (дезинфицирующие средства, текстиль, лакокрасочные изделия, косметика, упаковочные материалы, БАД

к пище) [1, 2], а также имеющие разнообразные биофармацевтические приложения, включая использование в качестве антимикробных [3, 4], противовоспалительных [5] препаратов и средств молекулярной нанодиагностики *in vivo* [6]. Вместе с тем НЧ серебра должны рассматриваться и как определенный источник рисков по причине их возможной токсичности для человека [7–15]. Особенно это относится к рискам, связанным с воздействием НМ на детский организм в результате их возможного переноса через плаценту, а также через грудное молоко [16]. Не ис-

ключена возможность поступления к потомству НМ, присутствующих в рационе матери или используемых ею в составе косметических средств или препаратов бытовой химии [17]. Количественная оценка такого переноса НЧ необходима для определения потенциальных рисков воздействия НЧ серебра, поступающих в организм матери, для потомства и разработки соответствующих защитных мероприятий, включая гигиеническое нормирование в потребительской продукции. Однако возможность переноса НЧ, естественным путем поступающих в организм матери, к ее потомству изучена крайне недостаточно в связи со специфическими методическими трудностями определения НЧ в составе биологических объектов [18, 19]. Анализ методов выявления НЧ в составе биологических образцов, включая электронную и атомно-силовую микроскопию, спектральные методы, хроматографию, использование флуоресцентных, спиновых, стабильно-изотопных и других меток [18], позволил выбрать в качестве оптимального метод радиоактивных индикаторов, являющийся строго количественным, высокочувствительным и допускающим простую и наглядную интерпретацию результатов применительно к НЧ, не подвергающихся биотрансформации и биодegradации в организме – НЧ золота, платины, серебра [20].

В представленной работе проведена количественная оценка транспорта НЧ серебра через плаценту, а также с грудным молоком на модели беременных и кормящих самок крыс с использованием препарата НЧ, меченных радиоактивным изотопом  $^{110m}\text{Ag}$ .

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Дизайн эксперимента

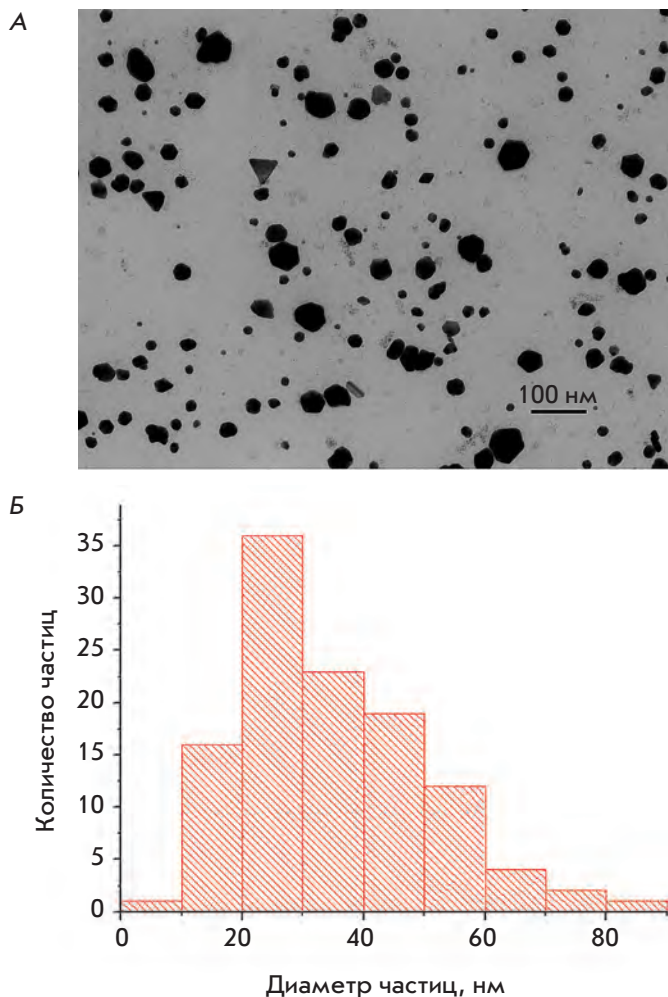
Исследование проведено на беременных и кормящих крысах линии «Вистар», содержащихся в клинике лабораторных животных ФГБУ «НИИ питания» РАМН. В преемственный период и на протяжении всей беременности и лактации самки получали стандартный полусинтетический рацион ФГБУ «НИИ питания» РАМН согласно [21]. Срок беременности самок составлял 20 дней после зачатия, срок лактации – в среднем 10–11 дней после рождения потомства. Беременным крысам  $^{110m}\text{Ag}$ -НЧ серебра вводили внутривентриально через зонд в дозе 1.69 мг/кг массы тела (три самки) и 2.21 мг/кг массы тела (четыре самки) в виде дисперсии в деионизованной воде, содержащей нетоксичный, неабсорбируемый в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) стабилизатор НЧ – поливинилпирролидон (ПВП) с молекулярной массой 15–30 кДа; после чего крыс помещали в индивидуальные клетки из полистирола. Через 24 ч после введения препарата крыс подвергали

глубокой анестезии диэтиловым эфиром, вскрывали брюшную полость, обескровливали из нижней полой вены и отбирали матку с плодами, печень и головной мозг. Плоды извлекали из матки, тщательно отмывали от околоплодной жидкости. После этого плоды, печень и головной мозг самок помещали во флаконы для гамма-спектрометрии из полиэтилена высокой чистоты. При отборе проб соблюдали меры предосторожности от загрязнения исследуемых органов и плодов крыс НЧ, которые содержатся в других внутренних органах и крови.

В эксперименте на лактирующих крысах пять самок, вскармливающих по 9 крысят каждая, получали внутривентриально раствор  $^{110m}\text{Ag}$ -НЧ серебра в дозе 2.11 мг/кг массы тела, после чего их возвращали в индивидуальные клетки из полистирола, в которых находилось их потомство. По условию эксперимента исключалась копрофагия экскрементов самок детенышами. Через 48 ч после введения метки крысят, вскармливаемых самкой, подвергали ингаляции диэтиловым эфиром в летальной дозе, тщательно промывали для удаления возможных следов экскрементов самки с шерстяного покрова, удаляли кожу с подкожно-жировой клетчаткой, а тушки помещали во флаконы для гамма-спектрометрии. Тушки четырех крысят вскрывали, выделяли ЖКТ, печень, почки, селезенку и остающийся каркас. Полученные препараты помещали по отдельности во флаконы для гамма-спектрометрии.

### Получение меченных $^{110m}\text{Ag}$ наночастиц

В работе использован препарат коллоидного серебра «Арговит» производства фирмы ООО НПЦ «Вектор-Вита» (Россия), который представлял собой водную дисперсию НЧ металлического серебра, содержащую 1.0–1.4% по массе серебра и 18.6–19.0% ПВП. По данным электронной микроскопии (рис. 1), средний диаметр НЧ составлял  $34.9 \pm 14.8$  нм; минимальный размер – 8.4 нм, максимальный – 80.9 нм; форма частиц была близка к сферической. Препарат разводили деионизованной водой в отношении 1 : 11 или 1 : 47 и запаивали в ампулы из высокочистого кварца, которые затем облучали потоком тепловых нейтронов ( $0.005 < E_n < 0.4$  эВ) в вертикальном экспериментальном канале ВЭК-9 ядерного реактора ИР-8. После извлечения из реактора ампулы выдерживали в течение 48 ч для уменьшения фона гамма-активности короткоживущего изотопа кремния в материале ампулы, вскрывали, объединяли содержимое, обрабатывали ультразвуком (5 мин, 44 кГц, 40 Вт) для устранения вторичной агрегации НЧ и доводили до фиксированного объема деионизованной водой. Непосредственно перед введением крысам отбирали 0.04 мл дисперсии меченных  $^{110m}\text{Ag}$  НЧ, что состав-



**Рис. 1.** Электронная микрофотография НЧ серебра в препарате «Арговит» (А) и гистограмма распределения частиц по диаметру (Б). Электронный микроскоп JEM-100CX (Jeol, Япония), ускоряющее напряжение 80 кВ. Исследование проведено в лаборатории иммунобиохимии ИНБИ им. А.Н. Баха РАН

ляло примерно 1% количества, вводимого крысам, переносили во флакон для гамма-спектрометрии и доводили деионизованной водой до объема, приблизительно соответствующего объему биологического образца (плода или тушки крысенка). Полученную пробу использовали в качестве эталона при определении активности биологических образцов.

**Анализ образцов**

Активность биологических образцов измеряли на гамма-спектрометре производства фирмы Canberra (США) в составе германиевого полупроводникового детектора GC4018, анализатора DSA-1000,

программного обеспечения Genie-2000 – Genie S501, Genie S502. Величины активности, выраженные в единицах импульсов в минуту в одном из выбранных энергетических диапазонов изотопа <sup>110m</sup>Ag [22], пересчитывали в относительные количества радиоизотопной метки (μ) в % от введенной дозы по формуле:

$$\mu = \frac{A_n}{A_s} \times (1/K),$$

где A<sub>n</sub> – активность биопробы, A<sub>s</sub> – активность эталонного образца, содержащего 0.04 см<sup>3</sup> дисперсии меченных [<sup>110m</sup>Ag]-НЧ, K – коэффициент пересчета, представляющий отношение индивидуального количества дисперсии НЧ (см<sup>3</sup>/кг массы тела), вводимой самкам, к усредненной дозе, полученной делением полного объема введенной дисперсии на суммарную массу тела всех самок в группе.

Концентрацию НЧ серебра в анализируемых пробах, выражаемую в нг/г образца, рассчитывали с учетом индивидуального количества НМ, введенного самке, по следующей формуле:

$$C = \mu \times D \times (F / s) \times 10^6,$$

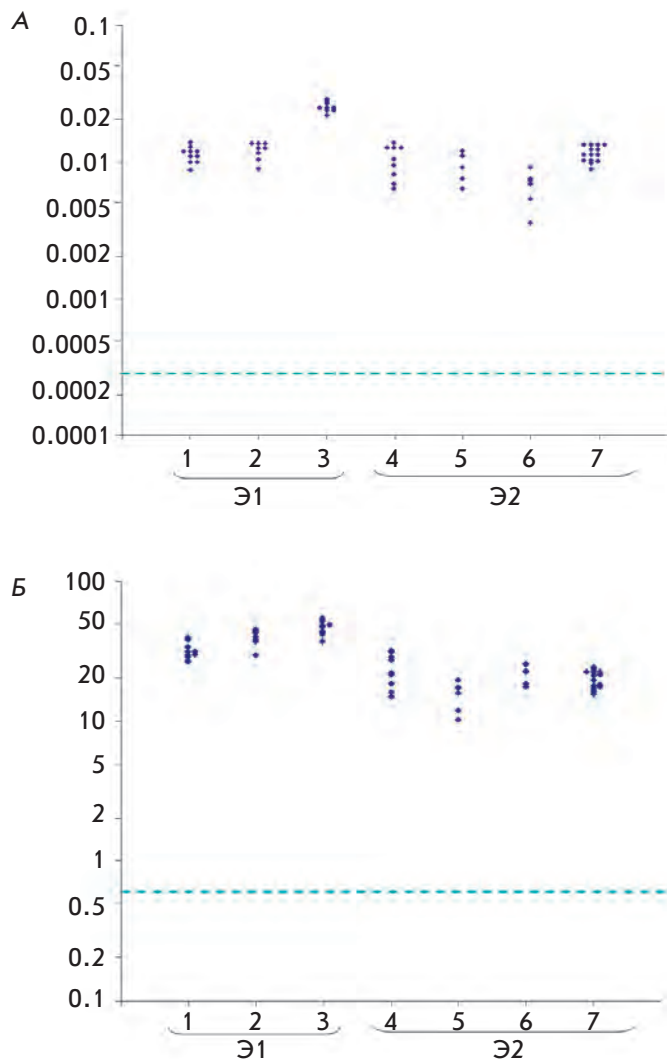
где μ – относительное количество радиоактивной метки, % от количества, введенного самке, D – вводимая доза, мг/кг массы тела, F – масса тела самки, кг, s – масса биологического образца, г, 10<sup>6</sup> – коэффициент перехода от мг к нг.

Использование для определения массы <sup>110</sup>Ag в биологических образцах метода относительных гамма-спектрометрических измерений позволило исключить из расчетов абсолютную активность (выраженную в Бк) и оперировать первичными данными измерений (имп./с), что позволило устранить ряд ошибок, возникающих при переходе от первичных данных к абсолютной активности. В этой ситуации основная ошибка измерений определяется значениями фона в выбранном энергетическом диапазоне. По этой причине при оценке минимального достоверного уровня скорости счета <sup>110m</sup>Ag в образцах использовали понятие минимальной детектируемой активности (МДА) в виде предела количественного определения L<sub>q</sub> [23, 24].

**Метрологическая характеристика метода**

При определении метрологических характеристик использовали понятие МДА в виде предела количественного определения L<sub>q</sub>, рассчитываемого по соотношению:

$$L_q = 5.66 \times \sqrt{R_b / T},$$



**Рис. 2.** Содержание (А) и концентрация (Б)  $^{110m}\text{Ag}$ -НЧ серебра в плодах крыс. Ось абсцисс – № беременной самки, № эксперимента; ось ординат – содержание НЧ, % от введенной дозы (А), концентрация НЧ (нг/г образца) (Б). Здесь и на рис. 3 пунктиром показан предел количественного определения  $^{110m}\text{Ag}$ -НЧ в образцах

где  $R_b$  – скорость счета фона, составляющая в применяемой гамма-спектрометрической аппаратуре  $2.64 \times 10^{-3}$  имп./с,  $T$  – среднее время измерения образца, равное 3600 с, а 5.66 – коэффициент, учитывающий доверительный интервал оценки  $p = 0.95$  и относительную статистическую неопределенность  $\pm 50\%$ . С учетом этого  $L_q = 4.8 \times 10^{-3}$  имп./с [23, 24]. Применительно к используемому препарату  $^{110m}\text{Ag}$ -НЧ соответствует минимальному пределу количественного определения 2.6 нг НЧ серебра.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2 представлены содержание и концентрация НЧ Ag в плодах крыс через 24 ч после внутрижелудочного введения  $^{110m}\text{Ag}$ -НЧ беременным самкам, а в табл. 1 приведены средние ( $M \pm m$ ) значения по каждой беременной самке и по эксперименту в целом, при двух использованных дозах НМ. Как следует из представленных результатов, НЧ серебра были выявлены во всех плодах от всех беременных самок в количествах, значительно превышавших предел определения. Полученные данные свидетельствуют о проникновении НЧ серебра через стенку кишки и плаценту с последующим накоплением в плодах.

Сравнение с данными о всасывании и межорганном распределении  $^{110m}\text{Ag}$ -НЧ, вводившихся внутрижелудочно самкам крыс в сопоставимой дозе (0.81 мг Ag/кг массы тела) [20], показывает (табл. 2), что проникновение НЧ Ag через плаценту более чем в 10 раз превышает накопление в головном мозгу, соответствует уровню в крови и селезенке и существенно ниже накопления в печени. Установленное в настоящем эксперименте содержание НЧ серебра в печени и головном мозгу беременных самок крыс (табл. 2) не отличалось статистически значимо от значений, полученных ранее для взрослых самцов [20] в сопоставимых условиях ( $P > 0.05$ ;  $t$ -критерий Стьюдента).

Как следует из данных, представленных на рис. 3 и в табл. 3, в организме всех 45 детенышей в пометах всех пяти лактирующих крыс обнаружены  $^{110m}\text{Ag}$ -НЧ, введенные внутрижелудочно лактирующим самкам. Концентрации этих НЧ значительно (в 100–1000 раз) превосходили предел количественного определения.

По условиям проведения эксперимента такие количества  $^{110m}\text{Ag}$ -НЧ невозможно объяснить заглатыванием детенышами экскрементов самок, содержащих значительные количества НЧ, загрязнением кожных покровов, удаленных перед проведением гамма-спектрометрии, а также заглатыванием подстилки, загрязненной мочой самки, поскольку полная экскреция НЧ серебра с мочой, как следует из данных [20], не превышала за 2 сут 0.032% от введенной дозы препарата, что в 60 раз меньше количества НЧ, суммарно обнаруженного в детенышах.

Как видно из табл. 4, максимальное количество  $^{110m}\text{Ag}$  обнаружено в ЖКТ детенышей, однако значимые (намного выше предела количественного определения) уровни наночастиц выявлялись и во внутренних органах, и в каркасе детенышей, что, в свою очередь, указывает на высокий уровень всасывания НЧ в их ЖКТ.

Как следует из табл. 3, общее количество метки  $^{110m}\text{Ag}$ -НЧ, экскретированной с молоком и за-



Таблица 1. Результаты определения [<sup>110m</sup>Ag]-наночастиц серебра в плодах самок крыс через 24 ч после внутрижелудочного введения препарата

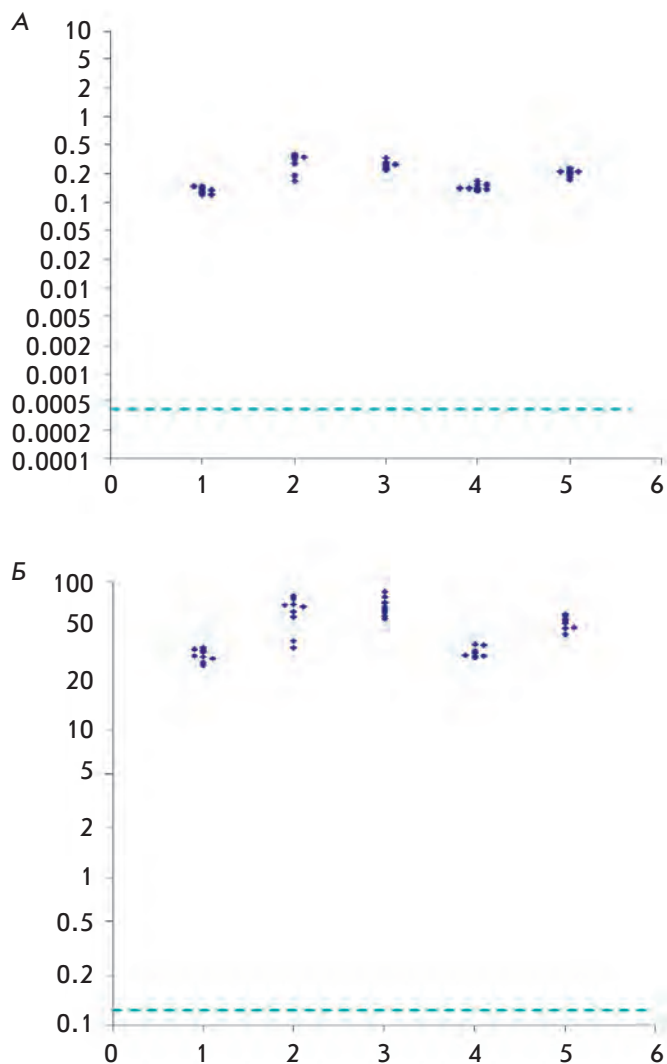
Доза НЧ, мг/кг массы	Самки крысы, №	Число плодов	Общее содержание НЧ в плоде, % от введенной дозы*	Концентрация НЧ в плоде, нг/г образца*	Масса плода, г*
1.69	1	10	0.0114 ± 0.0005	31.7 ± 1.4	2.66 ± 0.04
	2	8	0.0122 ± 0.0006	40.0 ± 1.8	2.13 ± 0.08
	3	9	0.0254 ± 0.0007	46.7 ± 1.8	4.07 ± 0.08
	Среднее (N = 27)		0.0163 ± 0.013	39.1 ± 1.5	2.97 ± 0.16
	Однородность распределения, ANOVA, P		< 0.001	< 0.001	< 0.001
2.21	4	9	0.0104 ± 0.0009	23.7 ± 2.2	3.91 ± 0.08
	5	5	0.0093 ± 0.0011	15.1 ± 1.8	5.72 ± 0.10
	6	6	0.0067 ± 0.0008	22.2 ± 1.4	3.07 ± 0.23
	7	14	0.0116 ± 0.0004	20.1 ± 0.8	5.26 ± 0.10
	Среднее (N = 34)		0.0101 ± 0.0005	20.7 ± 0.8	4.58 ± 0.18
	Однородность распределения, ANOVA, P		< 0.001	0.008	< 0.001

\* Средние значения, M ± m.

Таблица 2. Сопоставление накопления НЧ серебра в плодах и во внутренних органах крыс через 24 ч после внутрижелудочного зондового введения [<sup>110m</sup>Ag]-НЧ

Эксперимент	Доза [ <sup>110m</sup> Ag]-НЧ, мг/кг	Число животных	Биосубстрат	Содержание, % от введенной дозы
Самцы крыс, 2011 г.*	0.81	4	Каркас	0.36 ± 0.17
			Печень	0.60 ± 0.18
			Кровь	0.126 ± 0.051
			Селезенка	0.054 ± 0.020
			Гонады	0.016 ± 0.003
			Почки	0.014 ± 0.002
			Легкие	0.0094 ± 0.0026
			Головной мозг	0.0029 ± 0.0010
			Поджел. железа	0.0079 ± 0.0015
Сердце	0.0042 ± 0.0016			
Беременные самки**	1.69	3	Плоды (в сумме)	0.147 ± 0.041
			Печень	0.559 ± 0.229
			Головной мозг	0.0035 ± 0.0004
	2.21	4	Плоды (в сумме)	0.085 ± 0.028
			Печень	0.324 ± 0.046
		4	Головной мозг	0.0035 ± 0.0006

\*Из работы [20]; \*\* – настоящее исследование.



**Рис. 3.** Содержание (А) и концентрация (Б)  $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ серебра в детенышах крыс. Ось абсцисс – № кормящей самки; ось ординат – содержание НЧ, % от введенной дозы (А), концентрация НЧ (нг/г массы тела) (Б). Пунктиром показан предел количественного определения  $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ в образцах

регистрированной в крысятах, было сопоставимым (или даже большим) с единовременным суммарным содержанием метки во всех органах и каркасе животного после внутрижелудочного введения данного препарата (приведено в табл. 2 согласно [20]). Таким образом, есть основания полагать, что экскреция НЧ Ag с молоком при лактации – один из основных путей выделения этих наночастиц из организма, который количественно уступает только выведению с калом и намного превосходит выведение с мочой.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, при введении беременным и кормящим самкам крыс НЧ Ag в дозах, равных примерно 2 мг/кг массы тела, концентрация НЧ в органах и тканях их потомства составляет порядка 0.020–0.040 и 0.030–0.070 мкг/г ткани соответственно. Дозы НЧ серебра, вводимые самкам крыс, были достаточно высокими и в пересчете на среднюю массу тела человека (70 кг) составляли ~140 мг. Возможность единовременного экспонирования человека такими количествами НМ может возникнуть при потреблении загрязненной питьевой воды, пищевых продуктов или неправильного применения Ag-содержащих БАД. Полученные данные прямо подтверждают возможность передачи НЧ серебра, поступающих в желудочно-кишечный тракт матери, потомству в период как беременности, так и лактации. Возможность такого транспорта НЧ различных видов неоднократно постулировалась как потенциальный источник рисков, создаваемых ими для развития плода и новорожденного [16, 17], однако прямые экспериментальные подтверждения существования этого процесса немногочисленны. Показано [25], что НЧ серебра размером 14 нм в ограниченных количествах всасываются в желудочно-кишечном тракте взрослых крыс в ходе многократного 28-суточного внутрижелудочного введения и распределяются по органам и тканям, включая почки и печень. Данные о проникновении собственно НЧ серебра через фетоплацентарный барьер и молочную железу отсутствуют, однако имеются результаты, подтверждающие возможность переноса близких по физико-химическим свойствам наночастиц металлического золота размером 12–14 нм [26] после внутривенного введения беременным самкам мышей. Описано проникновение квантовых точек CdSe через фетоплацентарный барьер после парентерального введения самкам мышей [27], показана [28] способность флуоресцирующих НЧ полистирола диаметром 50–100 нм проникать через фетоплацентарный барьер, моделируемый монослоем клеток хориокарциномы человека. Полученные нами данные показывают, что в случае НЧ серебра процесс осуществляется *in vivo* в условиях естественного пути поступления НЧ в организм матери.

Возникает вопрос, насколько значимы концентрации НЧ, выявленные в плодах и детенышах крыс, и могут ли они оказать негативное воздействие на развитие и здоровье потомства? В настоящее время накоплено довольно много данных о биологических эффектах НЧ серебра при различных путях его поступления *in vivo*. Так, коллоидное серебро вводили мышам внутрибрюшинно в очень высоких дозах, вплоть до 1000 мг/кг [12]. В этих заведомо нефизиологических условиях НЧ проникали через

Таблица 3. Определение [<sup>110m</sup>Ag]-наночастиц серебра во вскармливаемых материнским молоком детенышах крыс через 48 ч после внутрижелудочного введения меченого препарата самкам

Самка, №	Число крысят	Общее содержание НЧ, % от введенной дозы*	Концентрация НЧ, нг/г массы тела*	Масса крысенка, г*
1	9	0.136 ± 0.004	31.9 ± 1.0	28.9 ± 0.4
2	9	0.302 ± 0.022	62.5 ± 5.2	29.2 ± 0.4
3	9	0.272 ± 0.009	68.5 ± 3.2	28.2 ± 0.8
4	9	0.150 ± 0.004	33.3 ± 0.9	31.4 ± 0.7
5	9	0.220 ± 0.007	52.9 ± 1.7	28.5 ± 0.2
Среднее по эксперименту (N = 45)		0.216 ± 0.011	49.8 ± 2.6	29.3 ± 0.3
Однородность распределения ANOVA, P		< 0.001	< 0.001	0.002
Суммарное содержание в помете, % от введенной дозы			1.94 ± 0.29	

Примечание. Доза НЧ – 2.11 мг/кг массы тела самки.  
\*Средние значения,  $M \pm m$ .

гематоэнцефалический барьер, вызывая развитие признаков окислительного стресса в различных отделах головного мозга. Показано генотоксическое действие НЧ серебра, введенного внутривентриально в дозе около 1 мг/кг массы тела мышей [13]. Интерпретацию результатов данной работы затрудняло присутствие в препарате НЧ токсичного ПАВ – диоктилсульфосукцината натрия. Установлено наличие ингаляционной токсичности НЧ серебра для крыс [14, 15]. При 28-дневном пероральном введении этого наноматериала в дозе до 30 мг/кг массы тела крысам не наблюдали признаков общетоксического и генотоксического действия, хотя НЧ серебра и накапливались в почках и печени животных [29]. Значительно более высокие дозы наночастиц серебра (вплоть до 1000 мг/кг массы тела), вводимые перорально, приводили к появлению определенных биохимических и гистопатологических сдвигов, что свидетельствовало о токсичности [8, 29].

В связи с токсическими свойствами НЧ серебра важно было оценить вероятность проявления токсичности у потомства животных, подвергающегося экспонированию этим веществом в результате трансплацентарного переноса или с молоком. Определенный интерес представляют данные о цитотоксичности НЧ серебра *in vitro*, полученные в условиях, когда точно известна концентрация НЧ. Так, показано, что НЧ серебра в концентрации 5–50 мг/см<sup>3</sup> повреждают культивируемые гепатоциты линии BRL3A крысы [30]. В опытах на сперматогонимальных клетках крысы цитотоксическое действие НЧ

серебра, идентифицируемое по высвобождению лактатдегидрогеназы и в тетразолиевом митохондриальном тесте, проявлялось, начиная с концентрации 5 мг/см<sup>3</sup> [31]. Наблюдали также стимуляцию апоптоза фибробластов мыши (с использованием теста активности каспазы-3) при концентрации НЧ серебра не менее 3.12 мг/см<sup>3</sup> [32]. НЧ серебра в концентрации не менее 10 мг/см<sup>3</sup> нарушали проводимость для ионов Na<sup>+</sup> в культуре нейронов гиппокампа линии CA-1 [33]. В опытах на мононуклеарных клетках периферической крови человека [34] показано, что НЧ серебра в концентрации 3 мг/см<sup>3</sup> и более стимулируют продукцию фактора некроза опухолей-α. Начиная с концентрации 15 мг/см<sup>3</sup>, отмечалось выраженное цитотоксическое действие НЧ серебра. Согласно [35] НЧ серебра, покрытые ПВП или цитратом, способны влиять на дифференцировку клеток феохромоцитомы PC12, имеющих нейроэндокринную природу. Минимальная действующая концентрация НЧ составляла 3 мкМ по серебру (около 0.3 мг/см<sup>3</sup>). Наконец, охарактеризовано действие НЧ серебра различного размера в первичной культуре нейронов коры головного мозга крысы [36]. Показано статистически значимое увеличение гибели клеток, культивируемых в течение 14 дней при минимальной концентрации НЧ размером 20 нм, равной 5 мг/см<sup>3</sup> и более. Токсичность НЧ снижалась при уменьшении их размера, так что НЧ диаметром более 40 нм были цитотоксичными, только начиная с концентрации 10 мг/см<sup>3</sup>.

Сравнение приведенных выше данных с результатами нашей работы позволяет утверждать, что кон-

центрации НЧ серебра в плодах крыс (не более 50 нг/г ткани при вводимой дозе НМ около 2 мг/кг массы тела, табл. 1) были в 60–300 раз ниже минимальных действующих концентраций НЧ, выявленных в системах *in vitro*. Однако такая оценка не учитывает возможность неоднородного распределения НЧ по органам и тканям плода. Известно, что НЧ серебра накапливаются преимущественно в почках и печени [20, 25]. Если предположить, что весь наноматериал накапливается только в одном из этих органов, масса которого на данном сроке гестации составляет 6.0 и 0.9% от массы плода, то получим заведомо завышенную концентрацию НЧ в органах – 830 и 5000 нг/г в печени и почках соответственно. Последняя величина сопоставима с определенной *in vitro* нижней границей возможного цитотоксического действия, равной приблизительно 3000–5000 нг/г. При этом следует учитывать, что вводимая беременным самкам крыс доза наноматериала, составлявшая ≈2 мг/кг массы тела, была аgravирована в 2000 раз по сравнению с верхним допустимым уровнем потребления серебра в любой форме (как в виде коллоидных частиц, так и ионов), равной 70 мкг или около 1 мкг/кг массы тела человека. Отсюда можно сделать вывод, что уровень накопления НЧ серебра в органах плодов крыс может с определенными оговорками рассматриваться как безопасный в случае поступления наночастиц серебра внутрь в физиологических количествах (например, вместе с питьевой водой или БАД к пище).

У крысят, получающих молочное вскармливание, средний уровень меченых НЧ составил 50 нг/г. Эта величина на 75% обусловлена меткой, находящейся в ЖКТ. Содержание НЧ в печени составляет 17.9%, а в почках – 0.9% от общего количества, обнаруженного в крысенке. Масса органов при данном сроке развития равна в среднем 3.8 и 1.2% массы тела, откуда следует, что концентрация НЧ в них составляет около 235 и 38 нг/г соответственно. Эти величины значительно ниже предполагаемого уровня цитотоксического воздействия и свидетельствуют о безопасности приема НЧ лактирующими самками в вышеуказанной заведомо аgravированной дозе для развития потомства.

Таким образом, на основании опубликованных данных можно сделать вывод, что уровни НЧ в тканях плодов и крысят, выявленные при однократном введении НЧ самкам крыс, не могут рассматриваться как опасные. В то же время необходимо учитывать, во-первых, возможность накопления НЧ в организме при их многократном поступлении, следовательно, уровень НЧ в органах и тканях будет выше, чем при однократной внутрижелудочной экспозиции, а во-вторых, неполное соответствие условий экспери-

**Таблица 4.** Межорганное распределение [<sup>110m</sup>Ag]-наночастиц серебра в организме крысят (N = 4) через 48 ч после внутрижелудочного введения меченого препарата самкам

Органы и ткани	Общее содержание наночастиц в крысенке, $M \pm m$	
	% от обнаруженного количества	% от дозы, скормленной самке
ЖКТ	73.8 ± 4.4	0.106 ± 0.006
Каркас	7.4 ± 1.4	0.0125 ± 0.0011
Печень	17.9 ± 3.0	0.0287 ± 0.0033
Почки	0.90 ± 0.18	0.0014 ± 0.0003

ментов *in vitro* и в организме. В частности, длительность экспозиции НЧ в клеточных культурах составляет часы, реже – до 7–14 дней, тогда как *in vivo* их воздействие может продолжаться в течение всей жизни. Поэтому изучение репродуктивной токсичности должно быть рекомендовано при комплексной оценке безопасности новых видов НЧ и НМ. Перенос НЧ через плаценту и грудное молоко следует учитывать при разработке процедур, направленных на максимальное ограничение контакта организма женщины с НЧ и НМ в период беременности и лактации.

### ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что при введении меченых изотопов <sup>110m</sup>Ag НЧ серебра в желудочно-кишечный тракт беременных и лактирующих самок крыс в дозе около 2 мг/кг массы тела, [<sup>110m</sup>Ag]-НЧ проникает через плаценту и поступает в материнское молоко в количествах, в 100–1000 раз превышающих чувствительность использованного аналитического метода.

2. Средний уровень накопления НЧ в плодах составлял 0.085–0.147% от введенной дозы, что было сопоставимо с аккумуляцией в печени самок (0.3–0.5% от введенной дозы), и, как минимум, в 10–100 раз превосходил проникновение НЧ через гематоэнцефалический барьер в головной мозг самок ( $3.5 \times 10^{-3}$ %).

3. У лактирующих самок суммарное поступление [<sup>110m</sup>Ag]-НЧ в молоко составляло не менее  $1.94 \pm 0.29\%$  от введенной дозы за 48 ч лактации; не менее 25% этого количества всасывалось в пищеварительном тракте крысят.

4. При введении НЧ серебра самкам крыс в дозе, аgravированной в 2000 раз по сравнению с адекват-



ным уровнем потребления этого микроэлемента, максимальные уровни этих НЧ выявлены в почках плодов, где они не были существенно больше токсических концентраций, установленных в опытах *in vitro*; в остальных случаях уровни НЧ были намного меньше действующих концентраций. Однако, учитывая возможные эффекты накопления НЧ в органах и тканях потомства при их длительном поступлении в материнский организм, рекомендуется изучение

репродуктивной токсичности НЧ при комплексной оценке их безопасности.

Таким образом, впервые получены экспериментальные доказательства переноса НЧ серебра от матери к потомству через плаценту и с грудным молоком. ●

*Авторы выражают искреннюю благодарность С.А. Хотимченко за полезное обсуждение результатов работы.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Верников В.М., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. // *Вопр. питания.* 2009. Т. 78. № 6. С. 13–20.
- Blaser S.A., Scheringer M., Macleod M., Hungerbühler K. // *Sci. Total Environ.* 2008. V. 390. № 2–3. P. 396–409.
- Fayaz M.A., Ao Z., Girilal M., Chen L., Xiao X., Kalachelvan P.T., Yao X. // *Int. J. Nanomedicine.* 2012. V. 7. P. 5007–5018.
- Acosta-Torres L.S., Mendieta I., Nuñez-Anita R.E., Cajero-Juárez M., Castaño V.M. // *Int. J. Nanomedicine.* 2012. V. 7. P. 4777–4786.
- Bhol K.C., Schechter P.J. // *Dig. Dis. Sci.* 2007. V. 52. № 10. P. 2732–2742.
- Chrastina A., Schnitzer J.E. // *Int. J. Nanomedicine.* 2010. V. 5. P. 653–659.
- Шумакова А.А., Смирнова В.В., Тананова О.Н., Трушина Э.Н., Кравченко Л.В., Аксенов И.В., Селифанов А.В., Сото Х.С., Кузнецова Г.Г., Булахов А.В. и др. // *Вопр. питания.* 2011. Т. 80. № 6. С. 9–18.
- Kim Y.S., Song M.Y., Park J.D., Song K.S., Ryu H.R., Chung Y.H., Chang H.K., Lee J.H., Oh K.H., Kelman B.J., et al. // *Part Fibre Toxicol.* 2010. V. 7. № 1. P. 20.
- Wijnhoven S.W.P., Peijnenburg W.J.G.M., Herberts C.A., Hagens W.I., Oomen A.G., Heugens E.H.W., Roszek B., Bisschops J., Gosens I., Van De Meent D., et al. // *Nanotoxicology.* 2009. V. 3. № 2. P. 109–138.
- Онищенко Г.Г., Арчаков А.И., Бессонов В.В., Бокитько Б.Г., Гинцбург А.Л., Гмошинский И.В., Григорьев А.И., Измеров Н.Ф., Кирпичников М.П., Народицкий Б.С. и др. // *Гигиена и санитария.* 2007. № 6. С. 3–10.
- Онищенко Г.Г., Тутельян В.А. // *Вопр. питания.* 2007. Т. 76. № 6. С. 4–8.
- Rahman M.F., Wang J., Patterson T.A., Sainia U.T., Robinson B.L., Newporta G.D., Murdock R.C., Schlager J.J., Hussain S.M., Alia S.F. // *Toxicol. Lett.* 2009. V. 187. № 1. P. 15–21.
- Орджоникидзе К.Г., Рамайя Л.К., Егорова Е.М., Рубанович А.В. // *Acta Naturae.* 2009. T. 1. № 3. С. 99–101.
- Sung J.H., Ji J.H., Yoon J.U., Kim D.S., Song M.Y., Jeong J., Han B.S., Han J.H., Chung Y.H., Kim J. // *Inhal. Toxicol.* 2008. V. 20. № 6. P. 567–574.
- Jung J.H., Kim S.S., Yoon J.U., Park J.D., Choi B.S., Chung Y.H., Kwon I.H., Jeong J., Han B.S. // *Inhal. Toxicol.* 2007. V. 19. № 10. P. 857–871.
- Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., et al. // *Part. Fibre Toxicol.* 2005. V. 2. № 1. P. 8–43.
- Yokel R.A., MacPhail R.C. // *J. Occupational Med. Toxicol.* 2011. V. 6. № 7. P. 1–27.
- Распопов Р.В., Гмошинский И.В., Попов К.И., Красноярова О.В., Хотимченко С.А. // *Вопр. питания.* 2012. Т. 81. № 2. С. 10–17.
- Tiede K., Vohall A.B., Tear S.P., Lewis J., David H., Hasselov M. // *Food Add. Contam.* 2008. V. 25. № 7. P. 795–821.
- Бузулуков Ю.П., Гмошинский И.В., Распопов Р.В., Демин В.Ф., Соловьев В.Ю., Кузьмин П.Г., Шафеев Г.А., Хотимченко С.А. // *Мед. радиология и радиационная безопасность.* 2012. Т. 57. № 3. С. 5–12.
- Тышко Н.В., Жминченко В.М., Пашорина В.А., Селяскин К.Е., Мельник Е.А., Мустафина О.К., Сото С.Х., Трушина Э.Н., Гаппаров М.М.Г. // *Вопр. питания.* 2011. Т. 80. № 5. С. 30–38.
- База ядерных данных МАГАТЭ: [www.iaea.org/Our Work/Nuclear Data Service](http://www.iaea.org/Our Work/Nuclear Data Service).
- Исаев А.Г., Бабенко В.В., Казимиров А.С., Гришин С.И., Иевлев С.М. // *Пробл. безпеки атомних електростанцій І Чорнобиля.* Киев: НПП «АтомКомплексПрибор», 2010. № 13. С. 103–110.
- Lochamy J.C. The Minimum Detectable Activity Concept. EG&G ORTEC Systems Application Studies, PSD № 17, September 1981.
- Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larse A., Gao X., Vogel U., Mortensen A., Lam H.R., Larsen E.H. // *Part. Fibre Toxicol.* 2011. V. 8. P. 1–18.
- Yang H., Sun C., Fan Z., Tian X., Yan L., Du L., Liu Y., Chen C., Liang X., Anderson G.J., et al. // *Sci. Repts.* 2012. V. 2. № 11. P. 847–855.
- Chu M., Wu Q., Yang H., Yuan R., Hou S., Yang Y., Zou Y., Xu S., Xu K., Ji A., et al. // *Small.* 2010. V. 6. № 5. P. 670–678.
- Cartwright L., Poulsen M.S., Nielsen H.M., Pojana G., Knudsen L.E., Saunders M., Rytting E. // *Int. J. Nanomedicine.* 2012. V. 7. P. 497–510.
- Kim Y.S., Kim J.S., Cho H.S., Rha D.S., Kim J.M., Park J.D., Choi B.S., Lim R., Chang H.K., Chung Y.H., et al. // *Inhal. Toxicol.* 2008. V. 20. № 6. P. 575–583.
- Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. // *Toxicol. in vitro.* 2005. V. 19. № 7. P. 975–983.
- Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J., Hofmann M.C. // *Toxicol. Sci.* 2005. V. 88. № 2. P. 412–419.
- Arora S., Jain J., Rajwade J.M., Paknikar K.M. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009. V. 236. № 3. P. 310–318.
- Liu Z., Ren G., Zhang T., Yang Z. // *Toxicology.* 2009. V. 264. № 3. P. 179–184.
- Shin S.H., Ye M.K., Kim H.S., Kang H.S. // *Int. Immunopharmacol.* 2007. V. 7. № 13. P. 1813–1818.
- Powers C.M., Badireddy A.R., Ryde I.T., Seidler F.J., Slotkin T.A. // *Environ. Health Perspect.* 2011. V. 119. № 1. P. 37–44.
- Haase A., Rott S., Mantion A., Graf P., Plendl J., Thünemann A.F., Meier W.P., Taubert A., Luch A., Reiser G. // *Toxicol. Sci.* 2012. V. 126. № 2. P. 457–468.