

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ЦИНКА ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРЕПАРАТА «ИММУНОНАНОЦИНК»

Резюме

В статье затронута проблема токсичности наночастиц при попадании их в живой организм за счет приобретения ими новых свойств при переходе в наноразмерное состояние. Описан способ получения наночастиц цинка. Приведены данные результатов по изучению острой токсичности наночастиц цинка в составе иммуномодулирующего препарата «Иммунонаноцинк».

Summary

The article deals with the problem of toxicity of nanoparticles when they enter a living organism due to their acquisition of new properties during the transition to the nanoscale state. A method for producing zinc nanoparticles is described. The data on the results of the study of acute toxicity of zinc nanoparticles in the immunomodulating drug «Immunonanozinc» are presented.

Поступила в редакцию 20.11.2019 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наноматериалы находят широкое применение в биологии и медицине. Но, к сожалению, далеко не все свойства данных веществ в достаточной степени изучены. Известно, что некоторые наноразмерные металлы, а также их соединения обладают ярко выраженным токсическим эффектом, что требует особого внимания к проблеме изучения их взаимодействия с биологическими системами.

На сегодняшний день по номенклатуре Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) наночастицы – это объекты, размеры которых по крайней мере по одному измерению не превышают 100 нм [1]. Нанометр (нм) – одна миллиардная часть метра, или размер десяти атомов водорода, расположенных плотно.

При введении в организм таких частиц возникает опасность проявления ими цитотоксических эффектов, которые зависят от многих факторов [2]. На сегодняшний день установлено, что химические и биологические свойства наночастиц существенно отличаются от свойств исходного материала, из которого они были получены. Как правило, они проявляют уникальные

свойства, связанные с высоким соотношением их поверхности к объему, что говорит о большой эффективности их действия [3]. Так, при попадании наночастиц металлов в живой организм для их растворения требуется время. Поэтому важной особенностью наночастиц биоэлементов при введении в организм является пролонгированность их действия [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Целью исследования явилась токсикологическая оценка воздействия иммуностимулирующего препарата «Иммунонаноцинк» на лабораторных животных.

Главная проблема в создании антисептических составов на основе цинка состоит в соблюдении баланса между величиной их активности и продолжительностью антисептического действия. Поскольку коллоидные растворы цинка предназначены для введения животным, они должны удовлетворять еще ряду требований, главными из которых являются биохимическая совместимость с компонентами крови и размер частиц в диапазоне 50–100 нм, а также устойчивость к коагуляции в плазме крови.

Управление размерами частиц достигалось варьированием концентрации восстановителя, стабилизирующих добавок, а также добавок, влияющих на вязкость раствора. В качестве стабилизаторов коллоидных частиц были использованы растворимые в воде полимеры. В результате взаимодействия с полимерами на частицах металла формировалась оболочка (так называемый структурно-механический барьер), препятствующая контакту металлических частиц друг с другом и, следовательно, их агрегации и седиментации.

В качестве стабилизатора коллоидных растворов наночастиц использовались также бромиды и иодиды натрия или калия бромид и иодид. Ионы избирательно сорбируются на поверхности частиц цинка, в результате чего частицы приобретают отрицательный потенциал. Одноименно заряженные частицы отталкиваются, что предохраняет коллоидный раствор от коагуляции и последующей седиментации.

Усовершенствована методика синтеза наночастиц, которая заключалась в очистке коллоидного раствора от побочных продуктов, для чего было опробовано центрифугирование и последующее диспергирование осадка ультразвуком в режиме кавитации. Для полной очистки от примесей операция центрифугирование – диспергирование повторялась несколько раз. В качестве дисперсионной среды использовался полиэтиленгликоль со степенью полимеризации 200 (ПЭГ 200).

Таким образом, на базе РУП «Институт экспериментальной ветеринарии

им. С.Н. Вышелесского» были проведены исследования острой токсичности препарата «Иммунонаноцинк» и его действия на кожу и слизистые оболочки.

Для оценки токсичности использовали белых мышей обоего пола с живой массой 18–20 г. По принципу аналогов были сформированы группы животных по 5 голов в каждой. Препарат «Иммунонаноцинк» вводили подкожно в дозе 0,2 мл, но в различных концентрациях. Препарат растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида. Животным контрольной группы вводили изотонический раствор натрия хлорида в таком же объеме (таблица 1). За лабораторными животными было установлено клиническое наблюдение в течение 10 дней. В период проведения опыта поддерживали условия кормления и содержания, прием воды не ограничивали. Во время наблюдения за животными учитывали их поведенческие реакции, общее состояние, двигательную активность, отношение к корму, состояние шерстного покрова и выживаемость.

По окончании острых опытов экспериментальные животные подверглись эвтаназии с последующим осмотром внутренних органов.

Препарат будет считаться выдержавшим испытание, если в течение всего периода наблюдений ни одна из подопытных мышей не погибнет. Препарат будет считаться нетоксичным, если у подопытных животных не возникнет местных воспалительных явлений, потери массы, и все мыши останутся живы.

Таблица 1. – Схема опыта по определению острой токсичности препарата на основе наночастиц цинка «Иммунонаноцинк»

Группа животных	Доза препарата, мл	Количество мышей в группе	Способ введения	Концентрация наночастиц
Опытная № 1	0,2	5	подкожно	5,0 г/л (5 мг/мл)
Опытная № 2	0,2	5	подкожно	2,5 г/л (2,5 мг/мл)
Опытная № 3	0,2	5	подкожно	1,25 г/л (1,25 мг/мл)
Опытная № 4	0,2	5	подкожно	0,63 г/л (0,63 мг/мл)
Опытная № 5	0,2	5	подкожно	0,32 г/л (0,32 мг/мл)
Контрольная	0,2	5	подкожно	изотонический раствор натрия хлорида

Объектами оценки действия препарата «Иммунонаноцинк» на кожу и слизистые оболочки были кролики весом 1,8–2,0 кг, разделенные на опытные и контрольную группы. При кожной пробе исследуемый препарат наносили в чистом виде в дозах 0,5; 1,0, 5,0 и 10,0 мг/кг на предварительно подготовленный участок кожи. Кроликам контрольной группы в качестве плацебо применяли изотонический раствор натрия хлорида в том же объеме. Тестирование реакции проводили в течение 24 часов. При этом учитывали изменение температуры кожи, наличие отека, трещин, эритемы, изъязвлений.

При глазной пробе кроликам в конъюнктивальный мешок левого глаза закапывали по 2 капли препарата «Иммунонано-

цинк», а в правый – изотонический раствор натрия хлорида в том же объеме и на протяжении 24 часов наблюдали за реакцией слизистой оболочки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Острое токсическое действие препаратов изучали по общепринятым методикам [5, 6]. На первом этапе исследований острой токсичности препарата «Иммунонаноцинк» использовали подкожный путь введения. В результате проведенных исследований установлено, что препарат «Иммунонаноцинк» в концентрации от 50 мг/кг и ниже не вызывает каких-либо нарушений в общем состоянии и поведении животных (таблица 2).

Таблица 2. – Результаты по определению острой токсичности препарата «Иммунонаноцинк»

Группа животных	Показатель	Сутки после введения препарата									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Опытная № 1	количество выживших/павших	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0
	реакция на месте инъекции	-	-	-	4	4	4	4	4	4	4
Опытная № 2	количество выживших/павших	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0
	реакция на месте инъекции	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
Опытная № 3	количество выживших/павших	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0
	реакция на месте инъекции	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1
Опытная № 4	количество выживших/павших	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0
	реакция на месте инъекции	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Опытная № 5	количество выживших/павших	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0
	реакция на месте инъекции	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1
Контрольная	количество выживших/павших	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0
	реакция на месте инъекции	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Наблюдения за клиническим состоянием подопытных животных продолжали и после введения препарата, учитывали ко-

личество погибших животных и рассчитывали основные токсикологические параметры. Почти все лабораторные животные

в течение всего срока наблюдения были спокойными, активно двигались и имели хороший аппетит.

После введения наночастиц цинка в концентрации 50 мг/кг у 80 % мышей отмечалось незначительное уплотнение на месте инъекции, которое проходило через 2–3 дня.

Визуальный осмотр внутренних органов после вскрытия не выявил каких-либо патологических изменений, а их абсолют-

ная и относительная массы мало чем отличались от таковых показателей в контрольной группе.

В течение эксперимента не было выявлено достоверных изменений состояния кожи кроликов, получавших исследуемый препарат. Отсутствовали явления гиперемии, отека, изъязвления и другие изменения, что соответствовало 0 баллов по шкале оценки кожных проб [7] (таблица 3).

Таблица 3. – Оценка кожной пробы при использовании препарата «Иммунонаноцинк»

Группа животных и доза препарата	Наличие реакции					
	оценка в баллах			раздражающий эффект		
	3 ч	6 ч	24 ч	3 ч	6 ч	24 ч
Опытная № 1, 0,5 мг/кг	0	0	0	отр.	отр.	отр.
Опытная № 2, 1,0 мг/кг	0	0	0	отр.	отр.	отр.
Опытная № 3, 5,0 мг/кг	0	0	0	отр.	отр.	отр.
Опытная № 4, 10,0 мг/кг	0	0	0	отр.	отр.	отр.
Контрольная	0	0	0	отр.	отр.	отр.

Проведенная визуальная оценка состояния конъюнктивы, роговицы и век глаз животных после нанесения исследуемого вещества позволила установить, что препарат «Иммунонаноцинк» не вызывает раздражения конъюнктивы как сразу после инстилляций, так и в течение всего периода наблюдения, что соответствовало 0 баллов

по шкале оценки конъюнктивальной пробы [7] (таблица 4). Следовательно, положительные результаты проведенных исследований позволяют нам утверждать, что препарат «Иммунонаноцинк» не обладает местно-раздражающим действием при нанесении на кожные покровы и слизистые оболочки глаз.

Таблица 4. – Оценка конъюнктивальной пробы при использовании препарата «Иммунонаноцинк»

Группа животных и доза препарата	Наличие реакции					
	оценка в баллах			раздражающий эффект		
	3 ч	6 ч	24 ч	3 ч	6 ч	24 ч
Опытная № 1, 0,5 мг/кг	0	0	0	отр.	отр.	отр.
Опытная № 2, 1,0 мг/кг	0	0	0	отр.	отр.	отр.
Опытная № 3, 5,0 мг/кг	0	0	0	отр.	отр.	отр.
Опытная № 4, 10,0 мг/кг	0	0	0	отр.	отр.	отр.
Контрольная	0	0	0	отр.	отр.	отр.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность научных данных о наночастицах указывает на то, что они относятся к новому классу продукции, и характеристика их потенциальной опасности является обязательной. При разработке и создании новых лекарственных препаратов на основе наночастиц металлов вопрос токсичности и определение зон их биологического действия при введении в организм является важным и актуальным.

Проведенная токсикологическая оценка препарата «Иммунонаноцинк» при подкожном применении в максимально допустимых дозах показала, что данный

препарат не вызывает патологических изменений органов или общего состояния животных. Установлено, что препарат является малотоксичными. LD50 при подкожном введении рассчитать не удалось ввиду отсутствия гибели животных при использовании максимально допустимых объемов. Также опытным путем установлено, что исследуемый препарат не оказывает раздражающего эффекта на кожу и слизистые оболочки глаза.

Таким образом, препарат «Иммунонаноцинк» можно считать выдержавшим испытания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра / Л.Ф. Абаева [и др.] / ГУ Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского // Альманах клинической медицины. – 2010. – № 22. – С. 10–16.
2. Букина, Ю.А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц и ионов серебра / Ю.А. Букина, Е.А. Сергеева // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – № 14. – С. 170–172.
3. Байтукалов, Т.А. Физико-химические особенности ранозаживляющих свойств наночастиц железа и магния в составе различных полимеров: автореф. дис. ... канд. хим. наук / Т.А. Байтукалов. – М., 2006. – 20 с.
4. Глуценко, Н.Н. Токсичность наночастиц цинка и его биологические свойства / Н.Н. Глуценко, А.В. Скальный // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2010. – № 3(21). – С. 118–121.
5. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев; под общ. ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
6. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / А.Э. Высоцкий [и др.]. – Минск, 2007. – 156 с.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; под ред. В.П. Фисенко. – М.: Ремедиум, 2000. – 398 с.

Вакцина ассоциированная против пастереллеза, гемофилезного полисерозита и актинобациллярной плевропневмонии свиней

«РЕСПИС-ПГА»

- Содержит бактерии *Pasteurella multocida* серовариант А (штамм КМИЭВ-В150), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (штамм «КМИЭВ-В169»), *Haemophilus parasuis* (штамм КМИЭВ-В171), инаktivированные формалином и эмульгированные в масляном адъюванте.
- Одна иммунизирующая доза вакцины составляет 1,0 см³.
- Иммунитет у свиней наступает через 14 суток после вакцинации и сохраняется в течение 12 месяцев

**ДОСТОЙНАЯ
ЗАМЕНА
ИМПОРТУ!**



РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»

WWW.BIEVM.BY