

## **СРАВНЕНИЕ НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ И ЦИТРАТА СЕРЕБРА НА ОРГАНИЗМ ЛАБОРАТОРНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Анциферова А.А., Копаева М.Ю.

*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182 Россия,  
Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1*

### **Резюме**

Соединения серебра издавна используют в медицинских целях. В настоящее время существует значительное разнообразие его форм (наночастицы, соли) и не вполне ясно, какая из них наиболее эффективна и, в то же самое время, безопасна. Так, в данной работе проводится сравнительное исследование нейротоксического действия наночастиц серебра, стабилизированных поливинилпирролидоном, размером  $8.7 \pm 0.4$  нм и цитрата серебра. Препараты серебра вводили ежедневно перорально в количестве 50 мкг в сутки лабораторным мышам линии C57BL/6 в течение 60 суток и оценивали их поведенческие и когнитивные функции. После экспозиции мышей наночастицами серебра обнаружено повышение тревожности в их поведении, а при экспонировании цитратом серебра отклонений в поведении от контрольной группы не наблюдали. Изменений долговременной контекстуальной памяти у мышей не обнаружено при экспонировании обеими изучаемыми формами серебра. Таким образом, цитрат серебра не демонстрирует нейротоксичности в отличие от наночастиц серебра и, предположительно, является более предпочтительной формой серебра для использования. Отсутствие токсических эффектов при экспонировании цитратом серебра, по всей видимости, связано с отличным механизмом взаимодействия ионов серебра с биологической клеткой по сравнению с наночастицами и биосовместимостью его аниона.

Ключевые слова: наночастицы серебра, цитрат серебра, нейротоксичность, млекопитающие, тревожность

**COMPARISON OF SILVER NANOPARTICLE'S AND SILVER CITRATE  
NEUROTOXICITY ON THE ORGANISMS OF LABORATORY MAMMALS**

Antsiferova A.A., Kopaeva M.Yu.

*National Research Center "Kurchatov Institute", 1, Akademika Kurchatova sq., Moscow 123182,  
Russia*

**Abstract**

Silver compounds are used for medical purposes from Ancient times. There are significant amount of its forms such as nanoparticles and salts today and it is not completely clear which of them is more effective and safe at the same time. Thus, in the present work a comparative research on neurotoxicity of silver nanoparticles coated with polyvinylpyrrolidone with the size  $8.7 \pm 0.4$  nm and silver citrate was conducted. Silver preparations were administrated into the organisms of C57Bl/6 laboratory mice daily orally in the amount of 50  $\mu\text{g}$  per day per animal during 60 days and their behavioral and cognitive functions were assessed after that. Silver nanoparticle exposure to mice ended up in the anxiety increase while there was no deviations in behavior in mice exposed to silver citrate. No changes of long-term contextual memory were detected at the exposure both to silver nanoparticles and silver citrate. Thus, silver citrate did not demonstrate any neurotoxicity unlike silver nanoparticles and therefore presumably this salt is more preferable form for oral therapeutic treatment than nanoform of silver. An absence of toxic effects at silver citrate exposure is due likely to different mechanisms of silver ion's interaction with a biological cell in comparison to the nanoparticles and the biocompatibility of its anion.

**Key words:** silver nanoparticles, silver citrate, neurotoxicity, mammals, anxiety

**ВВЕДЕНИЕ**

Металлическое серебро благодаря своим антисептическим свойствам использовали в медицинских целях еще в Древнем Египте, Месопотамии и Древней Индии. В XVII в. начали применять ляпис (нитрат серебра) [1]. После понимания причин инфекционных заболеваний начали активно использовать коллоидное серебро (аргирол и протаргол). С начала XXI в. в связи с развитием нанотехнологий коллоидное серебро в форме наночастиц стали активно внедрять в легкую, пищевую, косметическую промышленность, медицину и фармацевтику. При этом, вскоре начали обсуждать потенциальную токсичность наночастиц: данному вопросу посвящено значительное количество отечественных и международных конференций, организованных за последние два десятилетия, а также публикаций в научных изданиях [2,3].

Известно, что серебро является условно эссенциальным элементом, но его роль в организме не вполне ясна. Предположительно, оно регулирует кишечный микробиоценоз и может оказывать стимулирующее действие на определенные клетки иммунной системы. Так, очевидно, что серебро в любой форме может оказывать токсическое действие по отношению к живым организмам. При этом, предлагают различать предельно допустимые дозы содержания серебра в воде с учетом степени растворимости соответствующих соединений. Так, предельно допустимая концентрация для нерастворимого серебра составляет  $0.1 \text{ мг/м}^3$ , тогда как для растворимых его форм –  $0.01 \text{ мг/м}^3$  [4]. Таким образом, серебро в форме соли, ионы которой способны образовывать истинные растворы в водной среде, а также наночастицы серебра с гидрофильной стабилизирующей оболочкой, образующие коллоидные растворы, проявляют большую токсичность. При этом, в настоящее время в медицине, например, при лечении бактериальных и вирусных инфекций, а также в гнойной хирургии используют преимущественно наночастицы серебра. По всей видимости, это обусловлено повышенной популяризацией нанотехнологий в новом тысячелетии. Следует также отметить, что в составе соли взаимодействовать с клеткой и оказывать токсическое действие способны не только катионы, но и анионы [5]. При этом, серебро в отличие от антибиотиков в меньшей степени демонстрирует мутагенные свойства: устойчивость к серебру отмечена только у грамотрицательных бактерий [6], что весьма повышает его востребованность.

Ряд мировых научных исследований показывает способность наночастиц серебра накапливаться в головном мозге млекопитающих [7-10]. При этом, продемонстрировано негативное влияние наночастиц серебра на их когнитивные и поведенческие функции [11-14], а именно: нарушения в формировании и консолидации памяти, обучении, снижении социального поведения и локомоторной активности, снижение кратковременной и долговременной памяти, повышение тревожности. Так, в работе [11] показано изменение поведенческих функций в три этапа в зависимости от периода введения наночастиц: увеличение уровня тревожности, выработка адаптационных механизмов, выражающихся в нарастании исследовательского поведения и нарушение долговременной контекстуальной памяти. Также имеются данные о способности серебра в солевой форме накапливаться в головном мозге млекопитающих (нитрата [15] и ацетата серебра [9, 16]), однако сведения об их влиянии на когнитивные и поведенческие функции в литературе отсутствуют.

В связи с вышесказанным, учитывая способность наночастиц серебра оказывать негативное влияние на поведенческие и когнитивные функции млекопитающих и отсутствие соответствующих данных в части такового влияния солевой формы серебра, остро встает вопрос о выборе оптимальной формы серебра для использования в промышленности и медицине,

минимизирующей возможные риски. Вероятно, достоинства наноформы серебра преувеличены и переоценены?

### ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование посвящено сравнению влияния перорального введения наночастиц серебра с гидрофильной стабилизирующей оболочкой и цитрата серебра в эквивалентных дозах на поведенческие и когнитивные функции лабораторных млекопитающих. Оба препарата серебра способны к образованию растворов в воде.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали наночастицы серебра, стабилизированные поливинилпирролидоном, в форме препарата Арговит-С (ООО НПЦ «Вектор-Вита», г. Новосибирск, Россия), представляющего собой сырье для пищевой промышленности и рекомендованного для использования в косметологии по данным производителя, а также применяемого в нетрадиционной медицине. Данный препарат выступал в качестве модели объекта исследования – наночастиц серебра с гидрофильной стабилизирующей оболочкой. Средний размер наночастиц определяли методом динамического рассеяния света (ДРС). Для определения стабильности исходного раствора наночастиц измеряли средний размер частиц через один год его хранения в темноте при температуре +2°C. В качестве соли был выбран цитрат серебра (SilverSalt, г. Санкт-Петербург, Россия) в связи с его относительной биосовместимостью и низкой токсичностью анионов по сравнению с нитратом серебра.

В качестве модели млекопитающих использовали мышей-самцов линии C57BL/6, полученных из Филиала "Столбовая" ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. В эксперименте с наночастицами животные были разделены на контрольную (Контроль 1, n=10) и экспериментальную (n=10) группы. В эксперименте с цитратом серебра также использовали контрольную (Контроль 2, n=12) и экспериментальную (n=12) группы. Мышей в течение всего исследования содержали в индивидуальных клетках в помещении с автоматически поддерживаемыми периодичностью 12-ти часовых циклов день/ночь и температурой  $23 \pm 2$  °C. Животные имели неограниченный доступ к пище и воде.

Препараты серебра вводили животным перорально в составе питьевой воды. При этом, для контроля выпитой жидкости поилки еженедельно взвешивали. Также производили еженедельный контроль массы тела мышей. Все контрольные мыши принимали очищенную воду (ООО «Фармсистемы», с. Беседы Московской области, Россия). Экспериментальные мыши получали искомые наночастицы или соль в количестве 50 мкг/сутки/животное по массе серебра. Растворы готовили также с использованием очищенной воды. Введение препаратов серебра проводили в течение 60 суток, затем мышей последовательно тестировали в поведенческих тестах «открытое поле» (ОП), «приподнятый крестообразный

лабиринт» (ПКЛ), «темно-светлая камера» (ТСК) и для оценки долговременной контекстуальной памяти использовали модель условно-рефлекторного замирания. В течение всего периода тестирования животным продолжали введение препаратов серебра во избежание их выведения. Мышей тестировали в течение 9 суток с перерывом в 1 сутки между различными тестами. Каждый из поведенческих тестов проводили в течение 1 суток, а модель условно-рефлекторного замирания реализовали в течение 2 суток с учетом 1 суток на обучение и 1 последующих суток на тестирование. Методика тестирования аналогична таковой, описанной в [11]. Все манипуляции с животными соответствовали требованиям приказа от 19.06.2013 № 267 МЗ РФ и Методическим рекомендациям МР 1.2.0048–11, а также были одобрены Локальным этическим комитетом НИЦ «Курчатовский институт» (№ 01 от 06.10.2021).

Статистическую обработку данных проводили в программном пакете GraphPad Prism 8.0.1 (La Jolla, США). Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным ДРС, средний размер наночастиц серебра оказался разным  $8.7 \pm 0.4$  нм (рис. 1). Причем, они демонстрировали хорошую стабильность: их размер не изменился в процессе хранения.

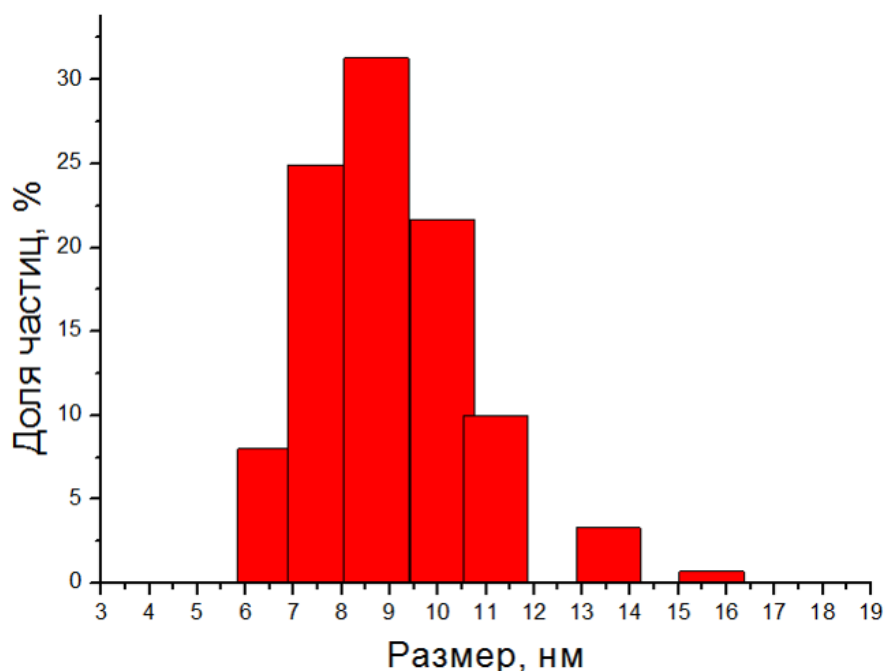


Рисунок 1. Гистограмма распределения числа частиц по размеру для наночастиц «Арговит»-С. Средний размер наночастиц равен  $8.7 \pm 0.4$  нм.

В течение всего исследования мыши прибавляли в весе, причем, статистически значимых различий между экспериментальными и контрольными группами не наблюдали.

Животные, экспонированные наночастицами серебра, показали изменения в поведении по сравнению с контролем (группа Контроль 1) (табл. 1). Резюмируя данные этой таблицы можно сделать вывод о повышении уровня тревожности мышей, экспонированных наночастицами серебра в течение 60 суток, что согласуется с ранее полученными нами данными [11].

Таблица 1.

**Сравнительная характеристика измеренных в поведенческих тестах параметров между контрольными и экспериментальными мышами, получавшими наночастицы серебра. В таблице представлены только статически значимо различающиеся параметры**

| № | Параметр                                      | Контроль 1     | 60 НЧ Ag           |
|---|-----------------------------------------------|----------------|--------------------|
| 1 | ОП, пройденный путь в промежуточной зоне (см) | $1200 \pm 138$ | $710 \pm 135^{**}$ |
| 2 | ОП, время в промежуточной зоне (с)            | $90 \pm 10$    | $52 \pm 10^*$      |
| 3 | ОП, время в пристеночной зоне (с)             | $180 \pm 13$   | $220 \pm 12^*$     |
| 4 | ОП, число заходов в центр (шт.)               | $7 \pm 1$      | $4 \pm 1^*$        |
| 5 | ТСК, время в светлом отсеке (с)               | $180 \pm 32$   | $100 \pm 23^*$     |

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  – отличия от группы Контроль 1.

Животные, экспонированные цитратом серебра, не показали статистически значимых различий по сравнению с контролем (группа Контроль 2).

Влияния на долговременную контекстуальную память не обнаружено ни при 60-ти дневной экспозиции мышей наночастицами серебра, ни при введении соли серебра. Это согласуется с результатами работ [11, 14], в которых нарушение долговременной контекстуальной памяти при экспонировании наночастицами, стабилизированными поливинилпирролидоном, размером  $34 \pm 5$  нм наблюдали только через 180 суток после их введения.

## ВЫВОДЫ

Результаты данного исследования свидетельствуют о наличии нейротоксических свойств у наночастиц серебра при ежедневном пероральном введении лабораторным млекопитающим, выражающихся в повышении уровня тревожности животных. У мышей, экспонированных цитратом серебра никаких отклонений в поведении по сравнению с

контролем не наблюдали. Влияния на долговременную контекстуальную память не обнаружено ни при экспонировании наночастицами, ни цитратом серебра. Данный результат, вероятно, обусловлен биосовместимостью цитрата серебра и его аниона. Использование соли серебра, образованного более сильной кислотой, предположительно может повысить вероятность токсического эффекта. Также результат данного исследования косвенно указывает на потенциально различающиеся механизмы взаимодействия наночастиц и ионов серебра с живыми организмами на клеточном уровне. По всей видимости, наночастицы серебра накапливаются в тканях в качестве депо ионов, постепенно их высвобождая.

Следует заметить, что для достоверной оценки перспектив использования цитрата серебра и наночастиц серебра требуется проведение тщательной токсико-гигиенической экспертизы данных соединений. Не исключены и другие, не рассмотренные в данной работе, токсические эффекты таких препаратов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Щербаков А.Б., Корчак Г.И., Сурмашева Е.В., и др. Препараты серебра: вчера сегодня, завтра. *Фармацевтический журнал*. 2006; 5: 45-57.
2. Zahoor M., Nazir N., Iftikhar M., et al. A Review on Silver Nanoparticles: Classification, Various Methods of Synthesis, and Their Potential Roles in Biomedical Applications and Water Treatment. *Water*. 2021; 13: 2216. <https://doi.org/10.3390/w13162216>
3. Agrawal Sh., Bhatt M., Kumar Rai S., et al. Silver nanoparticles and its potential applications: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018; 7(2): 930-937.
4. Drake P.L., Hazelwood K.J. Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review. *Ann. Occup. Hyg.* 2005; 49(7): 575-585. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mei019>
5. Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А., Русанова Е.В. Сравнительная характеристика антибактериального действия препаратов серебра и наносеребра in vitro. *Альманах клинической медицины*. 2016; 44(2): 221-226.
6. Randall C.P., Gupta A., Jackson N., et al, A.J. Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 1037–1046. <https://doi.org/10.1093/jac/dku523>
7. van der Zande M., Vandebriel R.J., Van Doren E., et al. Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure. *ACS Nano*. 2012; 6: 7427–7442. <https://doi.org/10.1021/nn302649p>

8. Lee J.H., Kim Y.S., Song K.S., et al. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague–Dawley rats. *Part Fibre Toxicol.* 2013; 10:36. [https://doi.org/ 10.1186/1743-8977-10-36](https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-36)
9. Recordati C., De Maglie M., Cella C., et al. Repeated oral administration of low doses of silver in mice: tissue distribution and effects on central nervous system. *Part Fibre Toxicol.* 2021; 18:23. <https://doi.org/10.1186/s12989-021-00418-x>
10. Ivlieva A.L., Petritskaya E.N., Rogatkin D.A., et al. Impact of Chronic Oral Administration of Silver Nanoparticles on Cognitive Abilities of Mice. *Physics of Particles and Nuclei Letters.* 2021; 18(2): 250–265. <https://doi.org/10.1134/S1547477121020072>
11. Antsiferova A., Kopaeva M., Kashkarov P. Effects of Prolonged Silver Nanoparticle Exposure on the Contextual Cognition and Behavior of Mammals. *Materials.* 2018; 11: 558. <https://doi.org/10.3390/ma11040558>
12. Greish K., Alqahtani A.A., Alotaibi at al. The Effect of Silver Nanoparticles on Learning, Memory and Social Interaction in BALB/C Mice. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2019; 16: 148. <https://doi.org/10.3390/ijerph16010148>
13. Dziendzikowska K, Węsierska M, Gromadzka-Ostrowska J, et al. Silver Nanoparticles Impair Cognitive Functions and Modify the Hippocampal Level of Neurotransmitters in a Coating-Dependent Manner. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (23):12706. <https://doi.org/10.3390/ijms222312706>.
14. Hritcu L., Stefan M., Ursu L., et al. Exposure to silver nanoparticles induces oxidative stress and memory deficits in laboratory rats. *Cent. Eur. J. Biol.* 2011; 6(4): 497-509. [https://doi.org/ 10.2478/s11535-011-0022-z](https://doi.org/10.2478/s11535-011-0022-z)
15. Qin G., Tang S., Li S., et al. Toxicological evaluation of silver nanoparticles and silver nitrate in rats following 28 days of repeated oral exposure. *Environmental Toxicology.* 2016; 32(2): 609-618. [10.1002/tox.22263](https://doi.org/10.1002/tox.22263)
16. Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., et al. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol.* 2011; 8(18): 1-14. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-18>

## REFERENCES

1. A.B. Shcherbakov A.B., Korchak G.I., Surmasheva E.V., i dr. Silver preparations: yesterday today, tomorrow. *Farmatsevticheskiy zhurnal.* 2006; 5: 45-57. (in Russian).
2. Zahoor M., Nazir N., Iftikhar M., et al. A Review on Silver Nanoparticles: Classification, Various Methods of Synthesis, and Their Potential Roles in Biomedical Applications and Water Treatment. *Water.* 2021; 13: 2216. <https://doi.org/10.3390/w13162216>

3. Agrawal Sh., Bhatt M., Kumar Rai S., et al. Silver nanoparticles and its potential applications: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018; 7(2): 930-937.
4. Drake P.L., Hazelwood K.J. Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review. *Ann. Occup. Hyg.* 2005; 49(7): 575-585. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mei019>
5. Petritskaya E.N., Rogatkin D.A., Rusanova E.V. Comparative characteristics of the antibacterial action of silver and nanosilver preparations in vitro. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2016; 44(2): 221-226. (in Russian).
6. Randall C.P., Gupta A., Jackson N., et al, A.J. Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 1037–1046. <https://doi.org/10.1093/jac/dku523>
7. van der Zande M., Vandebriel R.J., Van Doren E., et al. Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure. *ACS Nano*. 2012; 6: 7427–7442. <https://doi.org/10.1021/nn302649p>
8. Lee J.H., Kim Y.S., Song K.S., et al. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague–Dawley rats. *Part Fibre Toxicol.* 2013; 10:36. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-36>
9. Recordati C., De Maglie M., Cella C., et al. Repeated oral administration of low doses of silver in mice: tissue distribution and effects on central nervous system. *Part Fibre Toxicol.* 2021; 18:23. <https://doi.org/10.1186/s12989-021-00418-x>
10. Ivlieva A.L., Petritskaya E.N., Rogatkin D.A., et al. Impact of Chronic Oral Administration of Silver Nanoparticles on Cognitive Abilities of Mice. *Physics of Particles and Nuclei Letters*. 2021; 18(2): 250–265. <https://doi.org/10.1134/S1547477121020072>
11. Antsiferova A., Kopaeva M., Kashkarov P. Effects of Prolonged Silver Nanoparticle Exposure on the Contextual Cognition and Behavior of Mammals. *Materials*. 2018; 11: 558. <https://doi.org/10.3390/ma11040558>
12. Greish K., Alqahtani A.A., Alotaibi at al. The Effect of Silver Nanoparticles on Learning, Memory and Social Interaction in BALB/C Mice. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019, 16: 148. <https://doi.org/10.3390/ijerph16010148>
13. Dziendzikowska K, Węsierska M, Gromadzka-Ostrowska J, et al. Silver Nanoparticles Impair Cognitive Functions and Modify the Hippocampal Level of Neurotransmitters in a Coating-Dependent Manner. *Int J Mol Sci*. 2021, 22 (23):12706. <https://doi.org/10.3390/ijms222312706>.

14. Hritcu L., Stefan M., Ursu L., et al. Exposure to silver nanoparticles induces oxidative stress and memory deficits in laboratory rats. *Cent. Eur. J. Biol.* 2011; 6(4): 497-509. [https://doi.org/ 10.2478/s11535-011-0022-z](https://doi.org/10.2478/s11535-011-0022-z)
15. Qin G., Tang S., Li S., et al. Toxicological evaluation of silver nanoparticles and silver nitrate in rats following 28 days of repeated oral exposure. *Environmental Toxicology*. 2016; 32(2): 609-618. 10.1002/tox.22263
16. Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., et al. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol.* 2011; 8(18): 1-14. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-18>