

Анциферова А.А.<sup>1</sup>, Копаева М.Ю.<sup>1</sup>, Кочкин В.Н.<sup>1</sup>, Кашкаров П.К.<sup>1,2</sup>

## Влияние длительного перорального введения наночастиц серебра на когнитивные функции млекопитающих

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт"», 123182, Москва, Российская Федерация;<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, Российская Федерация

**Введение.** С начала XXI века наночастицы серебра широко используются в различных отраслях индустрии, медицине и фармацевтике благодаря своим выраженным антибактериальным, противовирусным и фунгицидным свойствам. В связи с такой высокой востребованностью использования наночастиц серебра очень важно понимать сопутствующие потенциальные риски от их применения.

**Материал и методы.** В работе изучали влияние длительного перорального введения коммерчески производимой биологически-активной добавки на основе наночастиц серебра размером 34 нм и стабилизированных поливинилпирролидоном в количестве 50 мкг/сутки/животное на когнитивные функции мышей линии C57Bl/6, а также их накопление в головном мозге методом инструментального нейтронно-активационного анализа. Используемая биологически-активная добавка рекомендуется людям для лечения желудочно-кишечных инфекций.

**Результаты.** Обнаружено, что наночастицы серебра при сроке введения 180 сут ухудшают долговременную контекстуальную память, а также с течением времени содержание серебра в головном мозге повышается.

**Заключение.** Нарушение когнитивных функций предположительно связано с накоплением серебра в головном мозге мышей. Это создаёт риск длительного перорального использования наночастиц серебра.

**Ключевые слова:** наночастица; наночастицы серебра; долговременная память; когнитивные функции; биокинетика; кинетика накопления; нейтронно-активационный анализ

**Для цитирования:** Анциферова А.А., Копаева М.Ю., Кочкин В.Н., Кашкаров П.К. Влияние длительного перорального введения наночастиц серебра на когнитивные функции млекопитающих. *Токсикологический вестник*. 2021; 29(6): 33-38. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-6-33-38>

**Для корреспонденции:** Анциферова Анна Александровна, кандидат физико-математических наук, и.о. заведующего лабораторией безопасности нанотехнологий и наноматериалов ФГБУ «НИЦ Курчатовский институт», 123182, г. Москва, Российская Федерация. E-mail: [antsiferova\\_aa@nrcki.ru](mailto:antsiferova_aa@nrcki.ru)

**Участие авторов:** Анциферова А.А. – концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи; Копаева М.Ю. – сбор и обработка материала, статистический анализ, ответственность за целостность всех частей статьи; Кочкин В.Н. – сбор и обработка материала, ответственность за целостность всех частей статьи; Кашкаров П.К. – концепция и дизайн исследования, редактирование, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 21-315-70016.

Поступила в редакцию: 15.11.2021 / Принята в печать: 23.11.2021 / Опубликовано: 30.12.2021

Antsiferova A.A.<sup>1</sup>, Kopaeva M.Yu.<sup>1</sup>, Kochkin V.N.<sup>1</sup>, Kashkarov P.K.<sup>1,2</sup>

# Effects of long-term oral administration of silver nanoparticles on the cognitive functions of mammals

<sup>1</sup>National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182, Russian Federation;<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russian Federation

**Introduction.** Since the beginning of the XXI century, silver nanoparticles have been widely used in various industries, medicine and pharmaceuticals due to their pronounced antibacterial, antiviral and fungicidal properties. In connection with such a high demand for the use of silver nanoparticles, it is very important to understand the associated potential risks from their use.

**Materials and methods.** In the course of the work, there has been a study of the effects of the long-term oral administration of a commercially produced dietary supplement based on silver nanoparticles with a size of 34 nm and stabilized with polyvinylpyrrolidone in an amount of 50 µg/day/animal on the cognitive functions of C57Bl/6 mice, as well as their accumulation in the brain by the method of instrumental neutron activation analysis. The dietary supplement used is recommended for people as a treatment for gastrointestinal infections.

**Results.** It was found that after 180 days of administration, silver nanoparticles impair long-term contextual memory, and over time, the content of silver in the brain increases.

**Conclusion.** Presumably impaired cognitive function with accumulation of silver in the brains of mice. This poses the risk of prolonged oral use of the silver nanoparticles.

**Keywords:** *nanoparticles; silver nanoparticles; long-term memory; cognitive functions; biokinetics; accumulation kinetics; neutron activation analysis*

**For citation:** Antsiferova A.A., Kopaeva M.Yu., Kochkin V.N., Kashkarov P.K. Effects of long-term oral administration of silver nanoparticles on the cognitive functions of mammals. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2021; 29(6): 33-38. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-6-33-38> (In Russian)

**For correspondence:** Anna A. Antsiferova, Candidate of physical and mathematical sciences, acting head of the Laboratory of nanotechnologies and nanomaterials safety of the National research center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182, Russian Federation. E-mail: [antsiferova\\_aa@nrcki.ru](mailto:antsiferova_aa@nrcki.ru)

**Author contribution:** Antsiferova A.A. – the concept and design of the research, writing the text, editing, approving the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article; Kopaeva M.Yu. – collection and processing of material, statistical analysis, responsibility for the integrity of all parts of the article; Kochkin V.N. – collection and processing of material, responsibility for the integrity of all parts of the article; Kashkarov P.K. – concept and design of the research, editing the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments.** The research was carried out with partial financial support from the Russian Foundation for Basic Research and the The Government of Moscow within the framework of scientific project No. 21-315-70016.

Received: November 11, 2021 / Accepted: November 23, 2021 / Published: December 25, 2021

## Введение

Серебро с древних времён известно благодаря своим антисептическим свойствам. Так, его использовали в медицинских целях ещё в Месопотамии и Древнем Египте. Вплоть до 1800 г. известны примеры его применения только в металлической форме. Позже стали использоваться его соли, а также коллоидные растворы [1]. С начала XXI века в связи с развитием нанотехнологий стали приобретать популярность наночастицы серебра, которые демонстрировали выраженные антисептические свойства. В настоящее время наноча-

стицы серебра широко применяются в виде биологически активных добавок и в качестве покрытия в раневых повязках, а также в других медицинских приложениях [2, 3].

При этом серебро и его наночастицы могут проявлять токсические свойства по отношению и к здоровым тканям организма. Токсичность серебра связывают с генерацией активных форм кислорода, обусловленной действием его ионов [4].

По всей видимости, наночастицы, накапливаясь во внутренних тканях организма, относительно медленно диссоциируют на ионы, выступая в качестве депо.

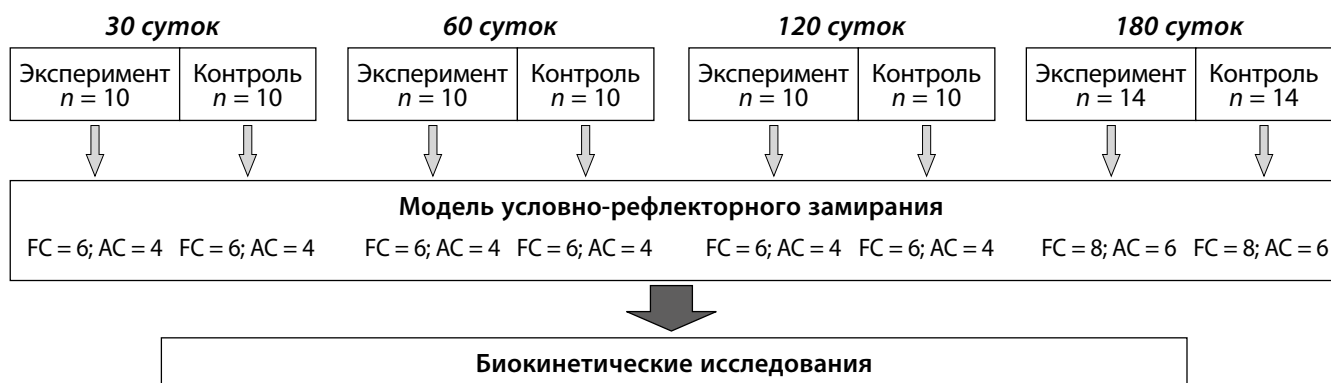


Рис. 1. Схематическое изображение эксперимента с млекопитающими.

Fig. 1. Schematic representation of a mammalian experiment.

Показано, что наночастицы могут аккумулироваться в головном мозге млекопитающих [5–7]. При этом процессы элиминации оказываются крайне затруднены. Так, после 2-месячного перорального введения наночастиц серебра размером 34 нм, стабилизированных поливинилпирролидоном, с последующей заменой раствора на дистиллированную воду, из головного мозга за один месяц выводится всего 5% серебра, в то время как из крови и печени 80 и 75%, соответственно [5].

Наночастицы серебра могут проявлять свойства нейротоксичности, выражающиеся в разрушительном действии на нейроны, астроциты и микроглию [8, 9], а также на когнитивные и поведенческие функции [10–12]. Большинство исследований на млекопитающих выполнялось на относительно коротких сроках введения наночастиц, не более 28 сут [10, 12]. В этих исследованиях были обнаружены изменения в долговременной и кратковременной памяти, снижении обучаемости, социального взаимодействия, двигательной активности и нарушении двигательных функций.

*Цель исследования* — оценить влияние длительного перорального введения наночастиц серебра млекопитающим на когнитивные функции и сопоставить с процессами возможного накопления серебра в головном мозге.

## Материал и методы

В работе использовалась коммерчески доступная биологически-активная добавка наночастиц серебра, стабилизированных поливинилпирролидоном — Арговит-С (ООО НПЦ «Вектор-Вита», Новосибирск, Россия). Эта биологически-активная добавка рекомендована для приёма людям с целью лече-

ния желудочно-кишечных инфекций [13]. Также определяли устойчивость растворов наночастиц после 1 года хранения в темноте, при температуре +2 °С.

В качестве модели млекопитающих использовали мышей-самцов линии С57В1/6 с массой тела 20–22 г, начиная с возраста 2 мес (Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России).

В качестве питьевой воды и для приготовления растворов наночастиц использовалась деионизованная вода (MilliQ, США).

Для определения размера наночастиц использовали метод динамического рассеяния света (ДРС) (Malvern, Великобритания).

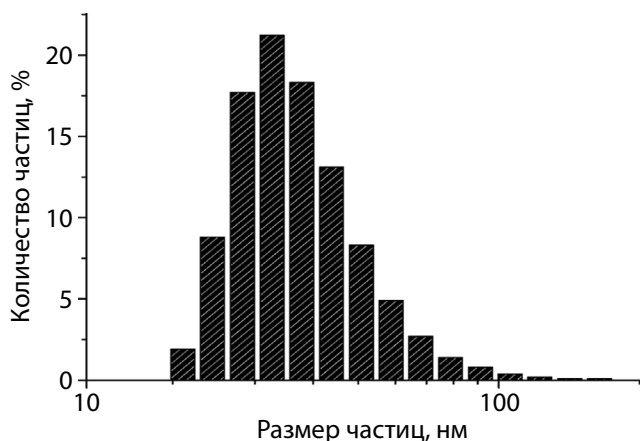
Когнитивные функции животных определяли в модели условно-рефлекторного замиранья с использованием системы видеорегистрации (MED Associate Inc, США).

Определение массы накопленного в головном мозге серебра проводилось методом нейтронно-активационного анализа с использованием ядерного исследовательского реактора ИР-8 (Москва, Россия) и гамма-спектрометра (CANBERRA, США).

*Схема эксперимента.* В течение всего эксперимента животных содержали в индивидуальных клетках с неограниченным доступом к пище и воде в помещениях с автоматически поддерживаемыми температурой  $23 \pm 2$  °С и 12/12-часовым циклом день/ночь.

Осуществляли еженедельный контроль изменения массы тела животных.

Мыши были разделены на 4 группы (рис. 1) по срокам введения наночастиц: 30, 60, 120, 180 суток. Каждая из этих групп также была разделена на 2 подгруппы: экспериментальная (введение наночастиц,  $n = 10$ ) и контроль (введение деионизованной воды,  $n = 10$ ).

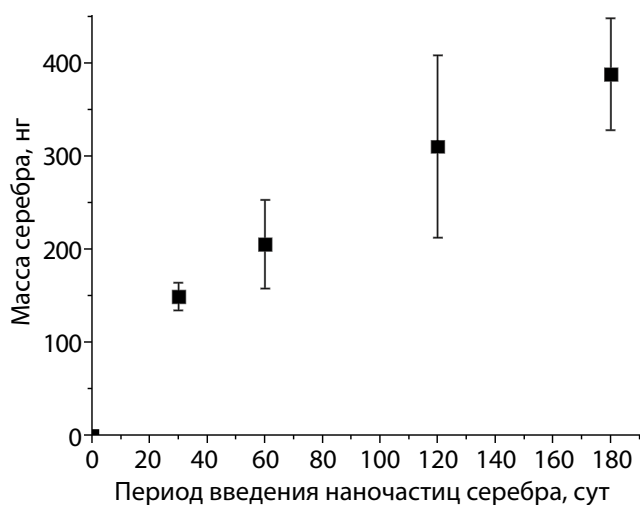


**Рис. 2.** Гистограмма распределения наночастиц «Арговит-С» по размерам, полученная с помощью ДРС. Средний размер  $34 \pm 5$  нм.

**Fig. 2.** Histogram of the size distribution of "Argovit-S" nanoparticles, obtained using DLS. Average size  $34 \pm 5$  nm. Axis of abscissas: particle size, nm; ordinate axis: number of particles, %.

Наночастицы вводили ежедневно перорально в количестве 50 мкг/сутки/животное в составе питьевой воды. Для определения уровня потребляемой жидкости поилки еженедельно взвешивались.

По истечении каждого срока введения животных тестировали в модели условно-рефлекторного замиранья. Для этого их делили на 2 группы: обусловливание страха (ФС) ( $n = 6$  для 30, 60 и 120 сут;  $n = 8$  для 180 сут) и активный контроль (АС) ( $n = 4$  для 30, 60 и 120 сут;  $n = 6$  для 180 сут). Мышей групп



**Рис. 3.** Содержание серебра в головном мозге в зависимости от времени введения наночастиц.

**Fig. 3.** Dependence of the silver content in the brain on the time of nanoparticles administration.

Axis of abscissas: the period of introduction of silver nanoparticles, days; ordinate axis: weight of silver, ng.

ФС помещали на 6 мин в экспериментальную камеру, где 3 мин они могли свободно изучать пространство, затем на пол подавали 3 электрокожных раздражения с интервалом 1 мин, силой 1 мА, длительностью 2 с. Животные группы АС свободно исследовали пространство камеры в течение 6 мин. После этого животных возвращали в «домашние» клетки. Через 24 ч после обучения животных тестировали на сохранность долговременной контекстуальной памяти в модели условно-рефлекторного замиранья, где обе группы могли свободно исследовать пространство в течение 3 мин без воздействия электрического тока. Время замиранья (%) рассчитывали автоматически в группах ФС и АС как отношение общей длительности актов замиранья в интервале к суммарной длительности интервала.

По окончании эксперимента мышей подвергали эвтаназии путем декапитации с предварительной наркотизацией изофлураном и отбирали головной мозг и др.

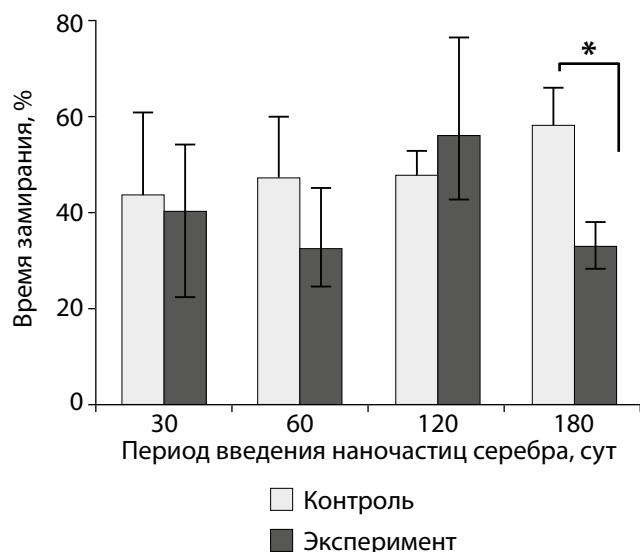
Образцы головного мозга высушивали в сушильном шкафу 72 ч при температуре  $75^\circ\text{C}$ . После этого помещали в полиэтиленовые контейнеры (Eppendorf, Германия) объемом 0,1 мл, герметично закрывали и нумеровали влагоустойчивым маркером.

Одновременно готовили эталонные образцы для облучения в канале ядерного реактора. Для этого в такие же пластиковые контейнеры помещали хлопчатобумажную вату и добавляли известное количество ГСО серебра (в 10 раз больше ожидаемого в экспериментальных образцах). Контейнеры оставляли открытыми и высушивали на воздухе в течение 48 ч, после этого герметично закрывали.

Экспериментальные, контрольные и эталонные образцы помещали в алюминиевые пеналы (АД1) и подвешивали в каналах ядерного реактора ВЭК-9 и ВЭК-10 на 24 ч, где они облучались в потоке  $10^{12}$  нейтронов/см<sup>2</sup>·с до получения необходимой активности по изотопу  $^{110\text{m}}\text{Ag}$  с периодом полураспада 250 сут.

## Результаты

Согласно данным ДРС, средний размер наночастиц в растворе оказался равным  $34 \pm 5$  нм (рис. 2). Раствор демонстрировал высокую устойчивость, так как средний размер частиц не изменился спустя 1 год хранения.



**Рис. 4.** Результат тестирования в модели условно-рефлекторного замирания: время замирания (%) для экспериментальной и контрольной групп для различных периодов введения наночастиц.

\* – После 180 суток введения наночастиц время замирания экспериментальных мышей было достоверно меньше, что говорит о нарушении долговременной контекстуальной памяти.

**Fig. 4.** Test result in the conditioned reflex freezing model: freezing time (%) for the experimental and control groups for different periods of nanoparticle administration.

Axis of abscissas: the period of introduction of silver nanoparticles, days; ordinate axis: time spent in a static position, %.

\* – After 180 days of nanoparticle injection, the freezing time of experimental mice was significantly.

Мыши нормально развивались в течение всего эксперимента. Статистически достоверных различий по массе тела среди контрольных и экспериментальных животных не наблюдалось.

Зависимость содержания серебра в головном мозге от времени введения наночастиц представлена на рис. 3. Видно, что она представляет собой монотонно возрастающую функцию, свидетельствующую о

накоплении серебра в головном мозге. При этом на рассматриваемых периодах времени кривая, по всей видимости, не достигает насыщения.

Согласно [11], мыши хорошо обучались условиям страха, так как время замирания в группах FC сразу после обучения статистически выше, чем для групп AC для всех периодов введения. Однако при сравнении времён замирания в тесте через 24 ч после обучения среди групп FC для одинаковых времён экспозиции, оно для группы мышей, получавшей наночастицы в течение 180 сут, статистически ниже, чем для контрольной группы (рис. 4). Это говорит о нарушении долговременной контекстуальной памяти.

## Заключение

Длительное пероральное введение наночастиц серебра оказывается небезопасным для млекопитающих, так как приводит к нарушениям памяти, которые, по всей видимости, связаны с накоплением серебра в головном мозге. Также они могут быть обусловлены реакциями на общеорганизменном уровне, которые предстоит изучить. В целом можно заключить, что длительный приём наночастиц серебра в виде биологически-активной добавки или фармацевтического препарата может привести к трудно-обратимым последствиям в силу накопления серебра в головном мозге и сниженной элиминации из него [5], что, в конечном итоге, приводит к нарушению долговременной контекстуальной памяти. При этом следует отметить, что вопрос о механизме влияния наночастиц на когнитивные функции млекопитающих остаётся открытым, в частности не ясна роль возможной диссоциации частиц на ионы.

## ЛИТЕРАТУРА

(пп. 4–13 см. в References)

1. Щербakov A.B., Korchak G.I., Surmasheva E.V., Skorohod I.M., Mihienkova A.I. Preparatsy srebra: vchera, segodnya, zavtra. *Farmaceuticheskij zhurnal*. 2006; 5: 45-57.
2. Yamanova R.R., Nikolaenko G.R. O primeneniі nanochastits srebra v legkoj promyshlennosti. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 2013; 16(22): 39-41.
3. Privolnev V.V., Zabrosae V.S., Danilenkov N.V. Preparaty srebra v mestnom lechenii infitsirovannykh ran. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoy medicinskoj akademii*. 2015; 14 (3): 85-91.

## REFERENCES

1. Shcherbakov A.B., Korchak G.I., Surmasheva E.V., Skorohod I.M., Mihienkova A.I. Silver preparations: yesterday, today, tomorrow. *Farmaceuticheskij zhurnal*. 2006; 5: 45-57. (in Russian)
2. Yamanova R.R., Nikolaenko G.R. On the use of silver nanoparticles in light industry. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 2013; 16(22): 39-41. (in Russian)
3. Privolnev V.V., Zabrosae V.S., Danilenkov N.V. Preparaty srebra v mestnom lechenii infitsirovannykh ran. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoy medicinskoj akademii*. 2015; 14 (3): 85-91. (in Russian)
4. Di He, Adele M. Jones, Shikha Garg, A. Ninh Pham, T. David Waite. Silver Nanoparticle-Reactive Oxygen Species Interactions: Application of a Charging-Discharging Model. *J. Phys. Chem. C*. 2011; 115(13): 5461-8.

5. Antsiferova A., Buzulukov Yu., Demin V., Kashkarov P., Kovalchuk M., Petritskaya E. Extremely low level of Ag nanoparticle excretion from mice brain in *in vivo* experiments. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*. 2015; 98. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012003>
6. Blanka Tariha Lovaković, Rinea Barbir, Barbara Pem, Walter Goessler, Marija Curlin, Vedran Micek, et al. Sex-related response in mice after sub-acute intraperitoneal exposure to silver nanoparticles. *Nanoimpact*. 2021; 23. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100340>
7. Inga Zinicovscaia, Sergey S. Pavlov, Marina V. Frontasyeva, Alexandra L. Ivlieva, Elena N. Petritskaya, Dmitriy A. Rogatkin, et al. Accumulation of silver nanoparticles in mice tissues studied by neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2018; 318: 985–9. <https://doi.org/10.1007/s10967-018-6193-6>
8. Hsiao I-Lun, Hsieh Yi-Kong, Chuang Chun-Yu, Wang Chu-Fang, Huang Yuh-Jeen. Effects of silver nanoparticles on the interactions of neuron- and glia-like cells: Toxicity, uptake mechanisms, and lysosomal tracking. *Environmental Toxicology*. 2017. <https://doi.org/10.1002/tox.22397>
9. Repar Neza, Li Hao, Aguilar Jose S., Li Qingshun Quinn, Drobne Damjana, Hong Yiling. Silver nanoparticles induce neurotoxicity in a human embryonic stem cell-derived neuron and astrocyte network. *Nanotoxicology*. 2018; 1–13. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1425497>
10. Węsierska M., Dziendzikowska K., Gromadzka-Ostrowska J., Dudek J., Polkowska-Motrenko H. Audinot J.N., et al. Silver ions are responsible for memory impairment induced by oral administration of silver nanoparticles. *Toxicology Letters*. 2018; <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.03.019>
11. Antsiferova Anna, Kopaeva Marina, Kashkarov Pavel. Effects of Prolonged Silver Nanoparticle Exposure on the Contextual Cognition and Behavior of Mammals. *Materials*. 2018; 11(4). <https://doi.org/10.3390/ma11040558>
12. Greish Khaled, Alqahtani Abdullelah, Alotaibi Abdulla, Abdulla Ahmed, Bukelly Aysha, Alsobyani Fanar, et al. The Effect of Silver Nanoparticles on Learning, Memory and Social Interaction in BALB/C Mice. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019; 16(1). <https://doi.org/10.3390/ijerph16010148>
13. <https://vector-vita.com/>

## ОБ АВТОРАХ:

**Анциферова Анна Александровна (Antsiferova Anna Alexandrovna)**, кандидат физико-математических наук, и.о. заведующего лабораторией безопасности нанотехнологий и наноматериалов НИЦ «Курчатовский институт», 123182, г. Москва, [antsiferova\\_aa@nrcki.ru](mailto:antsiferova_aa@nrcki.ru)

**Копеева Марина Юрьевна (Kopaeva Marina Yurievna)**, научный сотрудник НИЦ «Курчатовский институт», 123182, г. Москва, [m.kopaeva@mail.ru](mailto:m.kopaeva@mail.ru)

**Кочкин Вячеслав Николаевич (Kochkin Vyacheslav Nikolaevich)**, кандидат физико-математических наук, начальник лаборатории нейтронной дозиметрии НИЦ «Курчатовский институт», 123182, г. Москва, [kochkin\\_vn@nrcki.ru](mailto:kochkin_vn@nrcki.ru)

**Кашкаров Павел Константинович (Kashkarov Pavel Konstantinovich)**, доктор физико-математических наук, профессор, помощник президента НИЦ «Курчатовский институт», 123182, г. Москва, [kashkarov\\_pk@nrcki.ru](mailto:kashkarov_pk@nrcki.ru)

