

УДК: 546.67:612.6:57.084.1

DOI: 10.33396/1728-0869-2020-10-23-30

НЕОЖИДАННЫЙ ЭФФЕКТ ДЛИТЕЛЬНОГО ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИЕМА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА РОЖДАЕМОСТЬ У МЫШЕЙ

© 2020 г. *И. Зиньковская, А. Л. Ивлиева, Е. Н. Петрицкая, Д. А. Рогаткин

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского»,
г. Москва; *Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна

Наночастицы способны преодолевать биологические барьеры, поэтому их передача от матери к потомству через плацентарный барьер и при лактации с молоком может негативно сказываться на появлении, развитии и выживании потомства. *Основная цель* исследования – изучение когнитивных способностей у потомства самок мышей, имевших постоянный контакт с наночастицами серебра (AgNP) во время беременности и лактации. Данная работа – фрагмент исследований, связанный с обнаруженным неожиданным влиянием наночастиц на рождаемость. *Методы.* Начиная с недели до спаривания и до окончания лактации, экспериментальные самки пили раствор AgNP концентрацией 25 мкг/мл, контрольные мыши пили воду. Оценивалось количество потомства. Содержание серебра в органах и тканях у самок и потомства оценивалось методом нейтронно-активационного анализа. Эксперимент на рождаемость был повторен дважды. *Результаты.* В обоих экспериментах в экспериментальной группе рождаемость примерно вдвое превысила таковую в контрольной группе. Выживаемость потомства не различалась. В первом эксперименте родилось в экспериментальной группе 117 детенышей, в контрольной 62, средняя рождаемость на самку 4,68 (95 % ДИ: 3,87–5,61) и 2,48 (95 % ДИ: 1,9–3,18) соответственно, $p < 0,001$. Во втором эксперименте родилось 29 и 17 мышат в группах, средняя рождаемость на самку 5,8 (95 % ДИ: 3,8–8,33) и 3,4 (95 % ДИ: 1,98–5,44), $p = 0,077$. В образцах органов и тканей экспериментальных самок и потомства среднее содержание серебра составило $(3,77 \pm 2,03)$ и $(4,13 \pm 1,52)$ мкг/г соответственно, $p = 0,369$. В контрольной группе содержание серебра в образцах самок и потомства не превышало фонового уровня в $(0,05 \pm 0,04)$ мкг/г, $p < 0,001$. *Вывод.* Неожиданный, но выраженный и воспроизводимый эффект наночастиц серебра на рождаемость требует дальнейшего изучения и репликации в других исследованиях.

Ключевые слова: наночастицы, серебро, биологический барьер, хроническое воздействие, потомство, рождаемость, внутриутробное воздействие, нейтронно-активационный анализ

UNEXPECTED REPRODUCTIVE EFFECT OF PROLONGED ORAL ADMINISTRATION OF SILVER NANOPARTICLES IN LABORATORY MICE

*I. Zinicovscaia, A. L. Ivlieva, E. N. Petritskaya, D. A. Rogatkin

Moscow Regional Research and Clinical Institute named after M. F. Vladimirovskiy,
Moscow; *Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Moscow Region, Russia

Nanoparticles overcome biological barriers, therefore, their mother-to-offspring transmission through the placental barrier or during lactation may have deleterious effects on development and survival of the offspring. *The aim* of the study was to assess exposure to silver nanoparticles (AgNP) during pregnancy and lactation on cognitive impairments in the offspring in mice. This short report present unexpected findings on the effect of AgNP on fertility. *Methods.* Mice in the experimental group were received a solution of AgNP at concentration of 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ in drinking water from one week before mating until the end of lactation. Mice in the control group drank clean water during the same period. The silver content in mice organs and tissues was assessed by the neutron activation analysis. The experiment to count the offspring was repeated twice. *Results.* In both experiments an unexpected effect was observed: in the experimental group the birth rate was approximately twice as high as in the control group. In the first experiment, 117 pups were born in the experimental group vs. 62 in the control group. The average number of pups per mouse was 4.68 (95 % CI: 3.87–5.61) in the experimental group and 2.48 (95 % CI: 1.9–3.18) in the control group, $p < 0.001$. In the second experiment there were 29 vs. 17 pups, or 5.8 (95 % CI: 3.8–8.33) and 3.4 (95 % CI: 1.98–5.44) pups per mouse, respectively, $p = 0.077$. In the samples of organs and tissues of the experimental mice and pups, the average silver content was 3.77 ± 2.03 and $4.13 \pm 1.52 \mu\text{g/g}$ ($p = 0.369$), respectively. In the control group, the silver content in the samples of females and offspring did not exceed the background level of $0.05 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$ ($p < 0.001$). No difference in survival of the offspring was observed. *Conclusions:* We found a significant reproductive effect of silver nanoparticles in laboratory mice. These findings need replication in other studies. Further research on reproductive effects of silver nanoparticles is warranted.

Key words: nanoparticles, silver, biological barrier, chronic exposure, offspring, birth rate, prenatal exposure, neutron activation analysis

Библиографическая ссылка:

Зиньковская И., Ивлиева А. Л., Петрицкая Е. Н., Рогаткин Д. А. Неожиданный эффект длительного перорального приема наночастиц серебра на рождаемость у мышей // Экология человека. 2020. № 10. С. 23–30.

For citing:

Zinicovscaia I., Ivlieva A. L., Petritskaya E. N., Rogatkin D. A. Unexpected Reproductive Effect of Prolonged Oral Administration of Silver Nanoparticles in Laboratory Mice. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2020, 10, pp. 23–30.

В современном мире наночастицы поступают в организм человека пока еще в малых дозах и чаще всего естественными путями — с пищей и водой перорально, с воздухом ингаляционно, через кожу и т. д. [1, 5]. Однако в мировой литературе накоплен

уже достаточно большой объем доказательств токсичности наночастиц и наноматериалов, особенно углеродных нанотрубок и тяжелых металлов, для биологических тканей и органов даже в относительно небольших концентрациях [4, 12, 13, 24–26].

Проблема безопасности наноматериалов находится в центре внимания многих международных организаций примерно с начала 2000-х годов. В США исследования в этой области проводятся под эгидой FDA, в Евросоюзе — под эгидой OECD, IEC, EFSA, ECETOC. Такие международные организации, как ВОЗ, Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (ФАО), Международный институт наук о жизни (ILSI), также не остаются в стороне и инициируют различные научные исследования.

В России исследования по проблеме нанобезопасности стали проводиться по инициативе Роспотребнадзора с конца 2006 года (Постановление Главного санитарного врача Российской Федерации (РФ) от 31/10/2007 № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов»). В 2010 году были утверждены гигиенические нормативы ГН 1.2.2633-10 «Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды», которые впервые установили значения допустимых концентраций наноматериалов в воздухе рабочей зоны, в воде водоемов, а также в питьевой воде. Был разработан подход к оценке степени потенциальной опасности наноматериалов на основе метода математического моделирования, реализованный в методических рекомендациях (МР) по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека (МР 1.2.2522-09. — 2009). При этом исходным положением МР является то, что наноматериалы во всех случаях должны быть отнесены к новым видам продукции, поэтому характеристика потенциального риска от них для здоровья человека и состояния среды обитания является обязательной в соответствии с законами РФ № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» и № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».

Степень токсичности наночастиц зависит от множества факторов: природы наночастиц, их концентрации, формы и размеров, площади поверхности, среды, в которой они находятся, и т. д. [1, 25, 26]. Сильно влияет также и характер контакта человека с наночастицами — разовый или хронический [1, 4]. Последний наиболее опасен и характерен, например, для работников производств, имеющих дело с наночастицами, производящими их, и т. п. Тем более установлено, что наночастицы способны проникать сквозь биологические барьеры [1, 17, 22, 26], в частности через плацентарный барьер [7], накапливаться в тканях и органах [17, 25, 29], влиять на беременность [14, 27]. Из-за малого размера и низкой растворимости наночастицы (например, металлов), как правило, не распознаются защитными системами организма, не подвергаются химическому разложению и медленно или вовсе не выводятся из организма [9–11]. Процесс их накопления в организме может

быть на первых порах абсолютно незаметным для рабочего. Поэтому профессиональное сообщество врачей-профпатологов одними из первых забило тревогу и инициировали соответствующие исследования [1, 4, 10, 24]. Было даже высказано предположение, что в производственных условиях при хроническом контакте рабочих с наночастицами металлов и при их проникновении через гематоэнцефалический барьер в мозг у рабочих наноиндустрии могут возникать неизвестные ранее нозологические формы неврологических и психических профзаболеваний [1]. В том числе, безусловно, можно ожидать негативное влияние наночастиц металлов и на репродуктивное здоровье женщин, работающих на производстве наночастиц, потребляющих наночастицы с биологически активными пищевыми добавками, использующих косметику с наночастицами и т. д., а также на здоровье их детей, потенциально подвергающихся экспозиции наночастиц во время внутриутробного развития и/или в период грудного вскармливания [7, 14, 17, 22, 27].

На основании изложенного целью нашего основного трехлетнего исследования является изучение в эксперименте влияния хронического перорального приема коллоидного раствора наночастиц серебра (AgNP) на когнитивные способности потомства самок мышей, принимавших AgNP с начала периода спаривания до окончания периода лактации. Способность наночастиц металлов преодолевать плацентарный и гематоэнцефалический барьеры, их слабая растворимость и медленное выведение из организма, особенно после прохождения барьера, позволяет предположить возможное негативное влияние наночастиц не только на мозг матери, но и на когнитивные способности потомства. В своем исследовании мы изучаем когнитивные способности в экспериментах с пространственным научением и пространственной памятью [20].

Однако данное краткое сообщение посвящено наблюдению (case report) в рамках этого исследования неожиданного эффекта увеличения рождаемости у мышей, принимавших AgNP. В двух повторных одинаковых экспериментах наблюдалась практически удвоенная рождаемость в экспериментальных группах по сравнению с группами контроля, которые пили чистую воду вместо раствора AgNP.

Методы

В питомнике «Столбовая» (РФ, Московская область) были закуплены выведенные там мыши — белые, беспородные, аутбредной популяции (ICR), возраст 1,5–2 месяца. Генотип — генетически контролируемая закрытая колония нелинейных мышей. Данные мыши гетерозиготны по неопределённому числу генов, стандартно используются для оценки безопасности лекарственных препаратов, биологически активных добавок, косметических средств и т. д. Было закуплено для экспериментов 72 мыши: 50 самок и 10 самцов для первого эксперимента, 10 самок и 2 самца для второго эксперимента. Средний вес особи

составлял ($25,2 \pm 1,3$) г в первом эксперименте и ($28,3 \pm 1,0$) г во втором.

Методика экспериментов и условия содержания животных в виварии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского» (МОНКИ) были одобрены Этическим комитетом организации в 2019 году и соответствовали директиве Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 года о защите животных, использующихся для научных целей. Всех животных содержали в виварии МОНКИ в стальных клетках размером $31,5 \times 23 \times 15,7$ см, первоначально группами по 2–5 особей в клетке (самцов и самок отдельно), при естественном освещении и средней температуре воздуха $22–24$ °С, со свободным доступом к обычному комбикорму и питью (чистой воде). Клетки чистили раз в день.

В качестве источника AgNP использовали коммерчески доступный и серийно выпускаемый концентрированный (13 мг/мл) коллоидный раствор AgNP «Арговит-С». Производитель – ООО НПЦ «Вектор-Вита» (г. Новосибирск, РФ). Чтобы избежать агрегации наночастиц в растворе, производитель использует наночастицы размером менее 20 нм, поверхностно-стабилизированные оболочкой из поливинилпирролидона (ПВП) с концентрацией ПВП в растворе 187 мг/мл. Согласно [16] ПВП не обладает ни генотоксичностью, ни острой токсичностью, ни канцерогенностью, ни репродуктивной токсичностью, в том числе при повторных дозах. Способ получения наночастиц и их основные характеристики указаны в патенте [3]. Производитель гарантирует, что раствор сохраняет свои свойства в течение двух лет. Для исследований закупался свежий раствор, срок годности в процессе всех исследований не истекал. Диаметр AgNP в закупленном препарате (среднее \pm СКО) в ($8,7 \pm 1,4$) нм был подтвержден измерениями в НИЦ «Курчатовский институт». Для определения размеров AgNP использовался метод динамического рассеяния света на спектрометре Malvern [2]. Такой диаметр позволяет изучать проникновение наночастиц через гематоэнцефалический, плацентарный и любые другие биологические барьеры [1, 7, 26].

Экспериментальный раствор AgNP, покрытых оболочкой из ПВП, концентрацией 25 мкг/мл готовился авторами статьи путем разведения исходного концентрированного коллоидного раствора AgNP «Арговит-С» питьевой водой в соотношении 520:1. Раствор готовился в ходе эксперимента каждые 1–2 дня и разливался в питьевые бутылочки по мере их опорожнения мышами. Бутылочки имеют шаровую поилку, поэтому испарение раствора и изменение его концентрации за время опорожнения бутылочки мышами фактически исключено. Данная концентрация была выбрана в наших экспериментах как наибольшая из возможных для получения значимого токсического эффекта, но которая еще не приводит к повышенной

смертности в группе животных [19]. Хотя ранее мы сообщали об отсутствии токсического воздействия AgNP вплоть до концентраций в 100 мкг/мл [8] (при анализе гистологических препаратов сердца, печени, почек и селезенки мышей патологических изменений отмечено не было), в ряде последующих неудачных экспериментов мы наблюдали повышенную смертность животных в группе с концентрацией AgNP в 50 мкг/мл. В одном из таких экспериментов у нас погибло около 40 % животных в экспериментальной группе, поэтому упор в описываемых исследованиях был сделан на концентрации в 25 мкг/мл.

Для проведения исследования животных далее распределяли по двум равным группам, по 25 самок и 5 самцов в каждой в первом эксперименте и по 5 самок и 1 самцу в каждой во втором эксперименте. Через неделю после распределения животных по группам самцов посадили в клетки к самкам для размножения, по 1 самцу на 5 самок в одной клетке на три дня. С этого момента на протяжении 2 месяцев и одной недели, т. е. до окончания лактации (до момента, когда потенциальная передача наночастиц от матерей к потомству в принципе прекращается), экспериментальные самки пили раствор AgNP, к которому у них был свободный доступ, а контрольные самки – чистую воду тоже со свободным доступом (рис. 1). Самцы в период спаривания в экспериментальной группе так же свободно контактировали с раствором AgNP, как и самки. После спаривания и фиксации факта беременности самок самцов от них отсаживали. Таким образом, в экспериментальной группе рожденные детеныши, как минимум, могли контактировать с AgNP, прошедшими через плацентарный барьер во время пренатального развития, и с AgNP, получаемыми от матерей с молоком. Возможно и влияние самцов, подвергшихся экспозиции AgNP в период спаривания, на последующее зачатие и развитие плода.

Потомство подсчитывали дважды: в недельном возрасте (рождаемость) и по окончании лактации (выживаемость). Потомство оценивалось и сравнивалось по головам, в абсолютном выражении, какие-либо статистические методы оценки здесь не применялись в силу очевидности результата.

Потребление раствора мышами в эксперименте контролировалось ежедневно по уменьшению количества раствора в поилке. В эксперименте предполагалось, что в среднем каждая особь в клетке выпивает примерно равное количество жидкости в стуки в сравнении с сородичами, поэтому оценка потребления раствора AgNP в клетке на одну особь проводилась усредненно: общее выпитое количество жидкости делилось на число мышей в клетке. Предварительно было оценено среднее суточное потребление жидкости одной мышью при потреблении стандартного комбикорма в условиях виварии МОНКИ: одна особь за сутки выпивает в среднем ($5,43 \pm 0,40$) мл жидкости [6]. Таким образом, одна мышь в клетке в



Рис. 1. Свободный доступ животных к комбикорму и питью (раствору AgNP или воде)

условиях эксперимента с AgNP в среднем должна была потреблять в сутки порядка 135 мкг AgNP ($5,4 \text{ мл} \times 25 \text{ мкг/мл} = 135 \text{ мкг}$).

В исследование по изучению когнитивных дисфункций и уровня накопления AgNP в тканях и органах далее были включены только самки и их потомство, тогда как самцов использовали только для размножения. Оценку когнитивных способностей матерей и потомства в сравнении экспериментальной и контрольной групп проводили в водном лабиринте Мориса [19, 20]. Эти результаты детально будут описаны в других работах и не являются предметом данной статьи.

Для оценки накопления AgNP в тканях и органах экспериментальных животных в первом эксперименте по окончании лактации часть самок и потомства (по 5 особей соответственно) были усыплены методом внутрибрюшинного введения водного раствора уретана (из расчета 1,2 г сухого уретана на кг массы тела), и от каждой мыши были взяты образцы органов (головной мозг, печень, почки, легкие) и тканей (кровь). Образцы были упакованы в алюминиевую фольгу, высушены в течении 24 часов при температуре 75 °С и переданы в Лабораторию нейтронной физики им. И. М. Франка Объединенного института ядерных исследований (ОИЯИ, г. Дубна) для количественного определения содержания в образцах серебра методом нейтронно-активационного анализа [2, 7, 28, 29]. Метод реализован на установке РЕГАТА импульсного быстрого реактора ИБР-2 с кадмиевым низкотемпературным каналом. Температура в каналах облучения ИБР-2 не превышает 60–70 °С, обеспечивая анализ биологических образцов без их повреждения. Для определения содержания изотопов серебра и железа образцы облучаются в кадмиевом канале потоком резонансных нейтронов с $3,31 \times 10^{12}$ нейтронов на см² в секунду. Затем активность образцов, т. е. количественное содержание изотопов металлов, измеряется

дважды после времени охлаждения в 4 и 20 дней. Время одного измерения варьировало от 1,5 часа до 5 часов. Этот метод позволяет отдельно определять накопление серебра в крови и в клеточных мягких тканях, включая нейрональные ткани мозга, путем отдельного определения содержания активированного серебра в крови, в мягких клеточных тканях с кровью, и отдельного определения содержания крови в мягкой клеточной ткани по уровню содержания активированного железа, входящего в гемоглобин крови. То есть с помощью этого метода можно, например, для мозга определить содержание серебра именно от AgNP, прошедших гематоэнцефалический барьер.

В плане обработки результатов в программе OpenEpi version 3.01 (www.OpenEpi.com) был проведен анализ частот рождаемости на одну самку с расчетом двусторонних 95 % доверительных интервалов (95 % ДИ) и расчетом соотношений рождаемости в двух группах в каждом эксперименте. Статистическая значимость различий рассчитывалась с помощью точного критерия Фишера.

Дополнительно оценивалось отдельно для самок и потомства в обеих группах среднее арифметическое содержание серебра в образцах тканей и органов, а также стандартное отклонение (среднее \pm СКО). В программе IBM SPSS Statistics v25 (IBM corp., USA) проверялась гипотеза различия содержания серебра в образцах группы контроля и группы эксперимента отдельно для самок и их потомства. В силу невыполнения условий применения параметрических критериев сравнение содержания серебра в двух группах проводили с помощью критерия Манна — Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Во избежание эффекта случайности наблюдаемой повышенной рождаемости после первого случая наблюдения, как уже указывалось во введении, был проведен второй эксперимент, идентичный первому, но

только для оценки рождаемости без оценки накопления серебра в тканях в целях сохранения животных.

Результаты

В первом эксперименте рождаемость в экспериментальной группе была зафиксирована в количестве 117 детенышей, что значительно превышало таковую в контрольной группе (62 детеныша) почти в два раза. Выживаемость потомства была примерно равной в обеих группах: 97,4 % (114 из 117) и 100 % соответственно (точный критерий Фишера, $p = 0,552$). Средний показатель рождаемости (95 % ДИ) на одну самку составил в экспериментальной группе 4,68 (3,87–5,61) детёныша, в контрольной – 2,48 (1,9–3,18), точный критерий Фишера, $p < 0,001$. Таким образом, рождаемость в экспериментальной группе была статистически значимо в 1,89 раза выше, чем в контрольной (95 % ДИ: 1,39–2,57).

Во втором эксперименте были получены схожие данные: 29 детенышей родилось у экспериментальных самок и 17 у контрольных, и все потомство выжило (100 % выживаемость в обеих группах). Средний показатель рождаемости на самку (95 % ДИ) в экспериментальной группе составил 5,8 (3,88–8,33) детёныша, в контрольной – 3,4 (1,98–5,44), $p = 0,077$. Соотношение рождаемости в экспериментальной группе к контрольной во втором эксперименте составило 1,71 (95 % ДИ: 0,94–3,1).

Наглядно эти результаты представлены на рис. 2.

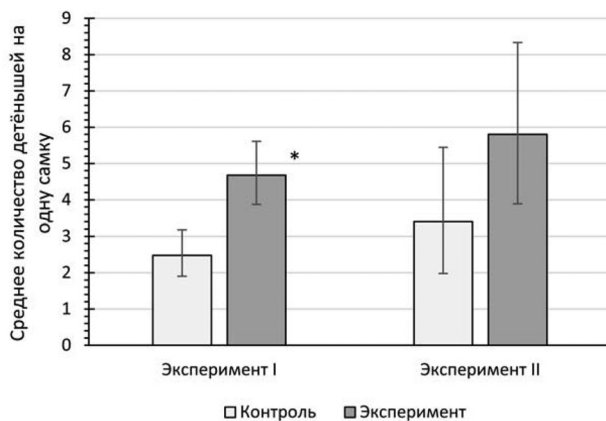


Рис. 2. Сравнение рождаемости на одну самку во время экспериментов I и II в контрольной и экспериментальной группах. Линии погрешности на графике представлены границами 95 % двустороннего доверительного интервала;

* – статистически значимые различия между группами

В образцах органов и тканей экспериментальных самок и их потомства содержание серебра составило (среднее \pm СКО): в мозге (серебро, прошедшее гематоэнцефалический барьер) – (0,36 \pm 0,08) и (0,38 \pm 0,10) мкг/г ($p = 0,371$) для самок и их потомства соответственно; в крови – (1,40 \pm 0,62) и (3,77 \pm 1,19) мкг/г ($p = 0,001$); в печени – (3,94 \pm 0,91) и (3,7 \pm 1,04) мкг/г ($p = 0,733$); в легких – (6,6 \pm 1,36) и (5,3 \pm 1,75) мкг/г ($p = 0,129$); в почках – (2,49 \pm 0,85) и (2,93 \pm 1,16) мкг/г ($p = 0,513$).

Как видно, кроме данных по крови, где содержание серебра отличается почти в 3 раза, у потомства больше, а у самок меньше, статистически значимых отличий содержания серебра в других тканях и органах между экспериментальными самками и их потомством зафиксировано не было. В среднем содержание серебра в органах и тканях экспериментальных самок и их мышат составило соответственно (3,77 \pm 2,03) и (4,13 \pm 1,52) мкг/г ($p = 0,369$). В контрольной группе содержание серебра в образцах как самок, так и потомства не превышало фонового уровня в (0,05 \pm 0,04) мкг/г ($p < 0,001$) при чувствительности метода в 2–3 нг/г [7]. Таким образом, во всех образцах экспериментальных животных и их потомства содержание серебра было минимум в 10 раз выше, чем у контрольных мышей.

Обсуждение результатов

В результате проведенных исследований было обнаружено содержание серебра в органах и тканях экспериментальных животных, как самок, так и их потомства, минимум в 10 раз превышающее таковое у контрольных животных. Повышенный уровень накопления серебра был зафиксирован в том числе и в нейрональной ткани мозга, причем как у матерей, так и у их потомства. Таким образом, хронический и непрерывный контакт самок с AgNP в период спаривания, беременности и лактации приводит не только к существенному накоплению AgNP в их тканях и органах, в том числе защищенных биологическими барьерами, но и к проникновению AgNP в организм потомства с преодолением минимум гематоэнцефалического барьера уже у детенышей. Однако этот результат можно считать в целом ожидаемым в свете высказываемых гипотез, теоретических положений и уже опубликованных результатов исследований других авторов [1, 7, 17, 24, 25, 27, 29].

Более неожиданной оказалась практически удвоенная рождаемость в экспериментальных группах по сравнению с группами контроля, причем она наблюдалась дважды подряд. Единственным различием между группами животных в обсуждаемом исследовании было наличие или отсутствие длительного контакта самок с AgNP, поэтому логично сделать предположение о влиянии на рождаемость либо AgNP, либо материала их покрытия – ПВП. Механизм такого влияния пока авторам не известен и требует, безусловно, дальнейшего изучения и объяснения (если результаты будут четко воспроизводиться в последующих экспериментах), особенно ввиду того, что обычно рассматривается токсическое и угнетающее воздействие AgNP на процесс размножения [23].

Особенностью проведенного и обсуждаемого исследования было то, что самки (и самцы) в данном исследовании начали потреблять AgNP в период спаривания, с ежедневным потреблением порядка 135 мкг AgNP, и продолжали контакт с ними длительно (хронически) на протяжении порядка двух месяцев. Известные на сегодня авторам из литературы

схожие эксперименты по оценке влияния наночастиц металлов на потомство животных [7, 8, 18] несколько различаются методически. Например, мы в своем исследовании 2011 года сообщали [8], что различий в потомстве экспериментальных и контрольных групп мышей при приеме самками AgNP нами не обнаружено. Однако в том исследовании экспериментальные самки подвергались хронической экспозиции AgNP на протяжении одного месяца и до периода спаривания. В период спаривания и беременности они уже пили чистую воду. То есть налицо меньшая продолжительность контакта самок с AgNP и другая схема эксперимента. Наоборот, в исследовании [7], которое проводилось на крысах, AgNP вводились самкам уже после зачатия в период беременности, один раз на 20-й день беременности. Средний размер AgNP был существенно больше, порядка 35 нм, и отсутствовала контрольная группа для оценки изменения рождаемости. Таким образом, если сравнивать полученный результат с результатами этих исследований, то можно сделать вывод, что ключевое отличие — воздействие AgNP в период спаривания.

Более или менее схожий с нашим эксперимент описан в [18]. Раствор AgNP серебра, размером (7.9 ± 0.95) нм, покрытие — цитрат, ежедневно вводили крысам принудительно через рот (через зонд): самцам — 42 дня (14 дней до спаривания, 14 дней во время спаривания, 14 дней после спаривания), а самкам — до 52 дней (начиная с 14 дней до спаривания и по первые 4 дня лактации). Экспериментальных животных разделили на три группы по 10 особей, 5 самцов и 5 самок, с различными суточными дозами получаемых AgNP: 62,5, 125 и 250 мкг на 1 г массы животного (существенно больше доза). Контрольным животным давали равный таковому у экспериментальных крыс объем дистиллированной воды. При подсчете потомства статистически значимых различий в рождаемости в группах эксперимента и контроля не зафиксировано, однако приведенное в публикации среднее на самку количество рожденных крысят в каждой из экспериментальных групп примерно на единицу выше группы контроля. Такой результат, отличный от нашего, может быть объяснен, например, очень большими дозами AgNP, использованием крыс вместо мышей (слабый довод), строгим использованием пар для размножения вместо группы из 5 самок на 1 самца, как в нашем эксперименте, или другими веществом покрытия наночастиц. Последнее заставляет задуматься над тем, что действующим фактором может оказаться не серебро как металл и не сами металлические наночастицы, а, в нашем случае, вещество покрытия — ПВП.

Безусловно, еще одним недостатком проведенного нами исследования в свете обсуждаемых результатов является отсутствие контроля гормонального статуса у самок и самцов в период их спаривания, в том числе отсутствие доказательства равного гормонального статуса в группах эксперимента и контроля, т. к. механизм влияния AgNP может быть связан, напри-

мер, с нарушением гормонального баланса в присутствии AgNP в организме самок [14]. Не исключено и влияние AgNP на гормональный статус самцов в период спаривания, т. к. известны, например, данные о влиянии AgNP на морфологию спермы [21]. Нельзя исключить и просто случайного факта наличия по каким-либо причинам повышенного гормонального статуса самок или самцов в группах эксперимента (самцы даже более вероятно, т. к. их было меньше, чем самок, в 5 раз).

Вместе с тем удвоенная рождаемость может указывать и на повышенное рождение однойцевых близнецов (наиболее интересная гипотеза, по мнению авторов). Из экспериментов известно [15], что у млекопитающих для достижения полиэмбрионии (для искусственного разделения групп клеток зародыша на разных стадиях его развития) достаточно выполнить отделение бластомеров друг от друга путем химического растворения блестящей оболочки (*zona pellucida*) или механически разделять морулу или бластоцисту, например, микро-лезвием на примерно равные по количеству клеток части. Если AgNP или материал их покрытия каким-то образом ослабляют структурные связи между гликопротеинами блестящей оболочки, вызывая ее преждевременный распад на 2–3-й день после оплодотворения, или препятствуют формированию клеточных контактов при образовании морулы (бластоцисты), то появление однойцевых близнецов в таком эксперименте становится объяснимым.

Безусловно, подтверждение существования влияния AgNP или их покрытия на рождаемость и объяснение механизма — это предмет дальнейших исследований. Сегодня можно лишь осторожно констатировать сам факт полученного результата. Возможно, это было исключительно случайное стечение обстоятельств. Однако эффект был нами отмечен дважды, а это может также указывать и на его закономерное проявление.

Заключение

Неожиданный эффект увеличения почти в два раза рождаемости у самок мышей, хронически контактировавших с AgNP в период спаривания, беременности и лактации, по сравнению с группой контроля наблюдался дважды в эксперименте. Удвоенная рождаемость может указывать на повышенное количество однойцевых близнецов. Однако это может быть и эффект от влияния AgNP на гормональный статус самок и/или самцов, а также быть случайным стечением обстоятельств. В любом случае требуется последующее воспроизведение эксперимента для подтверждения (опровержения) закономерности наблюдаемого эффекта с обязательным контролем гормонального статуса мышей-родителей и проверкой наличия однойцевых близнецов в выводках.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19-015-00145а.

Авторство

Зиньковская И., Рогаткин Д. А. и Петрицкая Е. Н. разработали общую концепцию исследований; Ивлиева А. Л. и Петрицкая Е. Н. разработали и предложили детальный план исследований, а также проводили основную работу с животными в виварии МОНИКИ и подготовили первый вариант статьи; Зиньковская И. работала с образцами тканей и органов животных, определяла содержание серебра в образцах тканей в ОИЯИ г. Дубна и внесла существенный вклад в подготовку обзора для первого варианта статьи; Рогаткин Д. А. внес существенный вклад в обсуждение и анализ полученных результатов, подготовил расширенный второй вариант статьи.

Конфликт интересов отсутствует.

Зиньковская Инга – SPIN 6814-1720; ORCID 0000-0003-0820-887X

Ивлиева Александра Леонидовна – SPIN 5555-1343; ORCID 0000-0002-0331-6233

Петрицкая Елена Николаевна – SPIN 2641-3111; ORCID 0000-0002-3836-0103

Рогаткин Дмитрий Алексеевич – SPIN 9130-8111; ORCID 0000-0002-7755-308X

Список литературы / References

1. Абаева Л. Ф., Шумский В. И., Петрицкая Е. Н., Рогаткин Д. А., Любченко П. Н. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра // Альманах клинической медицины. 2010. № 22. С. 10–16.

Abaeva L. F., Shumskii V. I., Petritskaya E. N., Rogatkin D. A., Lyubchenko P. N. Nanoparticles and nanotechnologies today and beyond. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny* [Almanac of Clinical Medicine]. 2010, 22, pp. 10-16. [In Russian]

2. Анциферова А. А., Бузулуков Ю. П., Демин В. А., Демин В. Ф., Рогаткин Д. А., Петрицкая Е. Н., Абаева Л. Ф., Кашкаров П. К. Методы радиоактивных индикаторов и нейтронно-активационного анализа для исследований биокинетики наночастиц в живом организме // Российские нанотехнологии. 2015. № 10 (1–2). С. 84–91.

Antsiferova A. A., Buzulukov Yu. P., Demin V. A., Demin V. F., Rogatkin D. A., Petritskaya E. N., Abaeva L. F., Kashkarov P. K. Radiotracer methods and neutron activation analysis for the investigation of nanoparticle biokinetics in living organisms. *Rossiiskie nanotekhnologii* [Nanotechnologies in Russia]. 2015, 10 (1-2), pp. 84-91. [In Russian]

3. Бурмистров В. А., Бурмистров А. В., Бурмистров И. В., Бурмистров А. В., Пестряков А. Н., Одегова Г. В., Богданчикова Н. Е. Способ получения коллоидных наночастиц серебра: пат. 2602534 С2 Российская Федерация. 2016. Опубл. 20.11.2016. Бюл. № 32.

Burmistrov V. A., Burmistrov A. V., Burmistrov I. V., Burmistrov A. V., Pestryakov A. N., Odegova G. V., Bogdanchikova N. E. *Sposob polucheniya kolloidnykh nanoplasticheskikh serebra* [Method of obtaining colloidal silver nanoparticles]. Patent RF, no. 2602534 C2, 2016.

4. Измеров Н. Ф., Ткач А. В., Иванова Л. А. Нанотехнологии и наночастицы – состояние проблемы и задачи медицины труда // Медицина труда и промышленная экология. 2007. № 8. С. 1–5.

Izmerov N. F., Tkach A. V., Ivanova L. A. Nanotechnologies and nanoparticles - state of problem and goals of occupational medicine. *Meditsina truda i promyshlennaya ehkologiya*. 2007, 8, pp. 1-5. [In Russian]

5. Кабешев Б. О., Бонцевич Д. Н., Бордак С. М. Нанотехнологии и их возможности // Проблемы здоровья и экологии. 2009. № 1. С. 144–149.

Kabeshev B. O., Bontsevich D. N., Bordak S. M. Nanotechnologies and their facilities. *Problemy zdorov'ya i ekologii* [Problems of health and ecology]. 2009, 1, pp. 144-149. [In Russian]

6. Лопатина М. В., Петрицкая Е. Н., Ивлиева А. Л. Зависимость потребления жидкости лабораторными мышами от рациона // Лабораторные животные для научных исследований. 2018. № 3. С. 96–99. DOI: 10.29296/261872X-2018-03-10

Lopatina M. V., Petritskaya E. N., Ivlieva A. L. Dependence of liquid intake in laboratory mice from diet. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* [Laboratory animals for science]. 2018, 3, pp. 96-99. DOI: 10.29296/261872X-2018-03-10 [In Russian]

7. Мельник Е. А., Бузулуков Ю. П., Демин В. Ф., Гмошинский И. В., Тышко Н. В., Тутельян В. А. Перенос наночастиц серебра через плаценту и молоко матери в эксперименте на крысах in vivo // Acta Nature. 2013. № 5 (3). С. 111–119.

Mel'nik E. A., Buzulukov Yu. P., Demin V. F., Gmo-shinskii I. V., Tyshko N. V., Tutel'yan V. A. Transfer of silver nanoparticles through the placenta and breast milk during in vivo experiments on rats. *Acta Nature*. 2013, 5 (3), pp. 111-119. [In Russian]

8. Петрицкая Е. Н., Абаева Л. Ф., Рогаткин Д. А., Литвинова К. С., Бобров М. А. К вопросу о токсичности наночастиц серебра при пероральном введении коллоидного раствора // Альманах клинической медицины. 2011. № 25. С. 9–12.

Petritskaya E. N., Abaeva L. F., Rogatkin D. A., Litvinova K. S., Bobrov M. A. On the problem of silver nanoparticles toxicity after oral administration of colloidal solution. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny* [Almanac of Clinical Medicine]. 2011, 25, pp. 9-12. [In Russian]

9. Потапов А. И., Ракитский В. Н., Тулакин А. В., Луценко Л. А., Ильницкая А. В., Егорова А. М., Гвоздева Л. Л. Безопасность наночастиц и наноматериалов для окружающей и производственной среды // Гигиена и санитария. 2013. № 3. С. 8–14.

Potapov A. I., Rakitskii V. N., Tulakin A. V., Lutsenko L. A., Il'nitskaya A. V., Egorova A. M., Gvozdeva L. L. Safety of nanoparticles and nanomaterials for environmental and occupational space. *Gigiena i Sanitariya*. 2013, 3, pp. 8-14. [In Russian]

10. Сутункова М. П. Оценка токсического действия наночастиц NiO при ингаляционном поступлении // Медицина труда и промышленная экология. 2019. № 2. С. 86–91. DOI: 10.31089/1026-9428-2019-2-86-91

Sutunkova M. P. The experimental assessment of NiO nanoparticles toxicity in inhalation exposure. *Meditsina truda i promyshlennaya ehkologiya*. 2019, 2, pp. 86-91. DOI: 10.31089/1026-9428-2019-2-86-91 [In Russian]

11. Трофимова С. А. Методологические подходы к оценке биологического действия наноматериалов // Journal of Biomedical Technologies. 2015. № 1. С. 38–44. DOI: 10.15393/j6.art.2015.3283

Trofimova S. A. Methodological approaches to assess the biological effect of nanomaterials. *Journal of Biomedical Technologies*. 2015, 1, pp. 38-44. DOI: 10.15393/j6.art.2015.3283 [In Russian]

12. Хотимченко С. А., Гмошинский И. В., Тутельян В. А. Проблема обеспечения безопасности нано-

размерных объектов для здоровья человека // Гигиена и санитария. 2009. № 5. С. 7–10.

Khotimchenko S. A., Gmshinskii I. V., Tutel'yan V. A. The problem of ensuring the safety of nanoscale objects for human health. *Gigiena i Sanitariya*. 2009, 5, pp. 7-10. [In Russian]

13. Bahadar H., Maqbool F., Niaz K., Abdollahi M. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iranian Biomedical Journal*. 2016, 20 (1), pp. 1-11. DOI: 10.7508/ibj.2016.01.001

14. Brohi R. D., Wang Li, Talpur H. S., Wu Di, Khan F. A., Bhattarai D., Rehman Z.-U., Farmanullah F., Huo L.-J. Toxicity of nanoparticles on the reproductive system in animal models: a review. *Frontiers in Pharmacology*. 2017. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5591883/> (accessed: 19.04.2020). DOI: 10.3389/fphar.2017.00606

15. Casser E., Israel S., Boiani M. Multiplying embryos: experimental monozygotic polyembryony in mammals and its uses. *International Journal of Developmental Biology*. 2019, 63, pp. 143-155. DOI: 10.1387/ijdb.190016mb

16. Food Safety Commission of Japan (FSCJ). Polyvinylpyrrolidone. Risk Assessment Report: Food Additives. Food Safety. 2014, 2 (1), pp. 12-13. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.2014012s

17. Hadrup N., Lam H. R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver - A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2014, 68, pp. 1-7. DOI: 10.1016/j.yrtph.2013.11.002

18. Hong J.-S., Kim S., Lee S. H., Jo E., Lee B., Yoon J., Eom I.-Ch., Kim H.-M., Kim P., Choi K., Lee M.Y., Seo Y.-R., Kim Y., Lee Y., Choi J., Park K. Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. *Nanotoxicology*. 2013, 8 (4), pp. 349-362. DOI: 10.3109/17435390.2013.780108

19. Ivlieva A. L., Demin V. A., Petritskaya E. N., Antsiferova A. A. Preliminary results on the impact of nanoparticles on brain functioning. *Materials Today: Proceedings*. 2017, 4, pp. 6901-6907. DOI: 10.1016/j.matpr.2017.07.019

20. Ivlieva A. L., Petritskaya E. N., Rogatkin D. A., Demin V. A. Methodological characteristics of the use of the Morris water maze for assessment of cognitive function in animals. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2017, 47 (4), pp. 484-493. DOI: 10.1007/s11055-017-0425-z

21. Lafuente D., Garcia T., Blanco J., Sánchez D. J., Sirvent J. J., Domingo J. L. Effects of oral exposure to silver nanoparticles on the sperm of rats. *Reproductive Toxicology*. 2016, 60, pp. 133-139. DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.02.007

22. Naik P., Cucullo L. In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J. Pharm. Sci.* 2012, 101 (4), pp. 1337-1354. DOI: 10.1002/jps.23022

23. Raj A., Shah P., Agrawal N. Dose-dependent effect of silver nanoparticles (AgNPs) on fertility and survival of *Drosophila*: An in-vivo study. *PLoS ONE*. 2017, 12 (5). Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0178051> (accessed: 19.04.2020). DOI: 10.1371/journal.pone.0178051

24. Schulte P. A., Schubauer-Berigan M. K., Mayweather C., Geraci Ch. L., Zumwalde R., McKernan J. L. Issues in the development of epidemiologic studies of workers exposed to engineered nanoparticles. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*. 2009, 51 (3), pp. 323-335. DOI: 10.1097/JOM.0b013e3181990c2c

25. Sharma A., Muresanu D. F., Patnaik R., Sharma H. S. Size- and age-dependent neurotoxicity of engineered metal nanoparticles in rats. *Molecular Neurobiology*. 2013, 48 (2), pp. 386-396. DOI: 10.1007/s12035-013-8500-0

26. Shilo M., Sharon A., Baranes K., Motiei M., Lellouche J. P. M., Popovtzer R. The effect of nanoparticle size on the probability to cross the blood-brain barrier: an in-vitro endothelial cell model. *Journal of Nanobiotechnology*. 2015, 13. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25880565/> (accessed: 19.04.2020). DOI: 10.1186/s12951-015-0075-7

27. Yang H., Sun C., Fan Z., Tian X., Yan L., Du L., Liu Y., Chen Ch., Liang X., Anderson G. J., Keelan J. A., Zhao Y., Niea G. Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy. *Scientific Reports*. 2012, 2, p. 847. DOI: 10.1038/srep00847

28. Zinicovscaia I., Grozdov D., Yushin N., Ivlieva A., Petritskaya E., Rogatkin D. Neutron activation analysis as a tool for tracing the accumulation of silver nanoparticles in tissues of female mice and their offspring. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2019, 322, pp. 1079-1083. DOI: 10.1007/s10967-019-06746-9

29. Zinicovscaia I., Pavlov S. S., Frontasyeva M. V., Ivlieva A. L., Pertritskaya E. N., Rogatkin D. A. Accumulation of silver nanoparticles in mice tissues studied by neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2018, 318 (2), pp. 985-989. DOI: 10.1007/s10967-018-6193-6

Контактная информация:

Рогаткин Дмитрий Алексеевич – доктор технических наук, доцент, заведующий лабораторией медико-физических исследований ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского»

Адрес: 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2.

E-mail d.rogatkin@monikiweb.ru