

УДК[546.57:547.458.88]+615.9+544.77

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ГИДРОЗОЛЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ПЕКТИНОМ, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

Василькевич В.М.¹, Богданов Р.В.¹, Колеснева Е.В.¹, Филиповская Е.Н.¹, Куликовская В.И.²

¹Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
Минск, Беларусь

²ГНУ «Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси»,
Минск, Беларусь

На клетках костного мозга и селезенки крыс in vivo изучено ДНК-повреждающее действие наночастиц серебра со средним диаметром 13±7 нм, синтезированных методом «зеленой» химии и стабилизированных биосовместимым природным полимером – пектином. Наноккомпозит пектин-серебро не вызывает увеличение спонтанного уровня хромосомных aberrаций в клетках костного мозга и селезенки аутбредных крыс при тестировании согласно рекомендациям OECD TG 475. Одновременно с этим в селезенке установлено увеличение клеток с признаками апоптоза и наличие «митотических катастроф», что свидетельствует об усилении митотической активности и пролиферации клеток селезенки.

Ключевые слова: наночастицы серебра, пектин, aberrации хромосом, апоптоз, митотическая катастрофа.

Для цитирования: Василькевич В.М., Богданов Р.В., Колеснева Е.В., Филиповская Е.Н., Куликовская В.И. Цитогенетические эффекты гидрозоля наночастиц серебра, стабилизированных пектином, в эксперименте *in vivo*. Медицина труда и экология человека. 2021; 2:60-71.

Для корреспонденции: Василькевич Вадим Михайлович, старший научный сотрудник лаборатории промышленной токсикологии, кандидат медицинских наук, e-mail: sabas2004@mail.ru.

Финансирование: Работа выполнена в рамках задания 02.03 и задания 04.04 ОНТП «Гигиеническая безопасность» (№ГР 20191607 и 20190391) и частично гранта Х19ИНДГ-002 «Разработка биосовместимых покрытий с антибактериальными свойствами для полипропиленовых хирургических сеток с целью улучшения их функциональности».

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2021-10205>

IN VIVO CYTOGENETIC EFFECTS OF A HYDROSOL OF SILVER NANOPARTICLES STABILIZED BY PECTIN

Vasilkevich V.M.¹, Bogdanov R.V.¹, Kaliasniova K.U.¹, Filipovskaya E.N.¹, Kulikouskaya V.I.²

1-Republican Unitary Enterprise “Scientific and Practical Centre of Hygiene”, Minsk,
Republic of Belarus

2-State Scientific Institution “Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus

DNA damage of silver nanoparticles with an average diameter of 13 ± 7 nm synthesized by the method of "green" chemistry and stabilized by a biocompatible natural polymer - pectin was studied in vivo on rat bone marrow and spleen cells. Pectin - silver nanocomposite does not cause an increase in spontaneous chromosomal aberration in the bone marrow and spleen cells of outbred rats when tested according to the recommendations of OECD TG 475. At the same time, an increase in cells with signs of apoptosis and the presence of «mitotic catastrophes» was established in the spleen, which indicates an increase in mitotic activity and proliferation of spleen cells.

Keywords: silver nanoparticles, pectin, chromosome aberrations, apoptosis, mitotic catastrophe.

Citation: Vasilkevich V.M., Bogdanov R.V., Kaliasniova K.U., Filipovskaya E.N., Kulikouskaya V.I. *In vivo* cytogenetic effects of a hydrosol of silver nanoparticles stabilized by pectin. *Occupational health and human ecology*. 2021: 2:60-71

Correspondence: Vadim M. Vasilkevich, Ph.D. in Medicine, Senior Researcher, e-mail: sabas2004@mail.ru.

Financing: The study was carried out within the framework of the sectoral scientific and technical program "Hygienic safety" (No.GR 20191607 and 20190391) and grant Kh19INDG-002 partially "Development of biocompatible coatings with antibacterial properties for polypropylene surgical meshes in order to improve their functionality."

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2021-10205>

Наночастицы серебра (НЧ Ag) получили наиболее широкое применение из всех известных наночастиц металлов и их оксидов. В 2011 году объем ежегодного мирового производства НЧ Ag составлял порядка 55 тонн (в пересчете на Ag) [1].

В настоящее время НЧ Ag синтезируют как физическими, так и химическими методами. При химическом синтезе необходимо вводить токсичные соединения, например, восстановители (гидразин, борогидрид натрия) или органические растворители (гексан), что ограничивает возможность применения полученных коллоидов в ветеринарии и медицине. В связи с этим в настоящее время все больше внимания уделяется синтезу НЧ Ag методами «зеленой» химии [2]. Одним из таких способов является восстановление ионов Ag⁺ полисахаридами в водных средах, обеспечивающих стабилизацию образующихся коллоидов Ag⁺.

В то же время НЧ Ag могут специфически взаимодействовать с биологическими клетками и молекулой ДНК, проявляя цитотоксические и цитогенетические свойства. Возможно, токсичность НЧ Ag опосредована действием активных форм кислорода (АФК), которые приводят к повреждению различных компонентов клетки, разрывам ДНК, индукции клеточного апоптоза и хромосомным aberrациям [3].

На фоне достаточного большого количества результатов экспериментов *in vitro*, исследований цитогенетических эффектов НЧ Ag *in vivo* недостаточно, а полученные результаты противоречивы. Так, в лейкоцитах крови крыс линии Вистар после внутривенного введения НЧ Ag (размерный диапазон по рентгенограмме $13 \pm 1 - 35 \pm 1$ нм; дозы – 4, 10, 20 и

40 мг/кг массы тела в течение 32 дней с интервалом в 5 дней) наблюдалось дозозависимое увеличение степени повреждений ДНК, установленное с помощью комет-анализа. Длина хвоста кометы в группе с дозой 40, 20, 10, 4 мг/кг были соответственно в 5,0, 4,7, 2,6 и 1,4 раза выше, чем в контрольной группе, что указывает на значительное увеличение повреждения ДНК при всех дозах НЧ Ag. [4]. Kim и соавт. (2010) были получены отрицательные результаты (отсутствие повреждения ДНК) в микроядерном тесте с эритроцитами костного мозга в эксперименте на крысах линии Sprague-Dawley после 28-дневного внутрижелудочного введения НЧ Ag (средний размер частиц 60 нм), в дозе – 30, 300 и 1000 мг/кг/день [5] и после 90-дневного ингаляционного воздействия НЧ Ag (средний размер частиц 18 нм, концентрации – 0,7, 1,4 и $2,9 \times 10^6$ частиц/см³, экспозиция 6 ч/день) [6].

В ряде исследований было показано, что мутагенность НЧ Ag по отношению к клеткам млекопитающих может быть значительно снижена, если в ходе их синтеза использовать различные типы органических стабилизаторов, из которых будет сформирована оболочка (сывороточные белки, поливинилпирролидон, полисахариды и т.д.), которые не оказывают влияния на антимикробную активность серебра [7]. Так, в работе Кирбик и соавт. (2015) при изучении мутагенного эффекта НЧ Ag в подостром опыте при внутрибрюшинном введении в дозе 25 мг/кг в сутки (4 сут) было установлено отсутствие мутагенного эффекта, что авторы объяснили использованием в эксперименте наночастиц с модифицированной поверхностью, заключенной в органическую оболочку, повышающую биосовместимость наночастиц и способствующую уменьшению мутагенности [8].

Таким образом, литературный анализ доступной информации о цитогенетических эффектах НЧ Ag позволяет констатировать, что имеющиеся данные, полученные в опытах *in vivo* недостаточны, а их трактовка неоднозначна. Отдельного изучения требует вопрос о влиянии стабилизирующих оболочек на индукцию НЧ Ag цитогенетических повреждений.

Цель – изучение в опыте *in vivo* цитогенетических эффектов гидрозоля НЧ Ag, стабилизированных пектином (далее - нанокompозит пектин-Ag).

Материалы и методы. НЧ Ag, стабилизированные оболочкой из высокометоксилированного пектина (степень этерификации 80,4%, средневязкостная молекулярная масса $141 \cdot 10^3$ г/моль), синтезировали в соответствии с принципами «зеленой» химии путем химического восстановления AgNO_3 в водных средах под действием природного полисахарида пектина по ранее разработанной методике [9, 10]. Спектры поглощения синтезированного нанокompозита пектин-Ag записывали на спектрофлуориметре CM2203 (Solar, Беларусь) в диапазоне 350-650 нм.

Количество непрореагировавших катионов серебра Ag^+ после синтеза, а также выделяющихся в процессе хранения гидрозолей определяли в диализных водах методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ContrAA 300, Analytik Jena AG, Германия).

Размер частиц определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на микроскопе JEOL-LEM-1400 (Jeol Ltd., Япония). Образцы для исследований готовили путем нанесения капли гидрозоля нанокompозита пектин-Ag на медные сетки с последующим высушиванием на воздухе.

Средний гидродинамический диаметр и ξ -потенциал нанокompозита пектин-Ag измеряли на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) методом

динамического рассеяния света и путем измерения электрофоретической подвижности частиц соответственно.

Условия эксперимента соответствовали рекомендациям Организации экономического содействия и развития (OECD/ОЭСР), приведенным в описании метода OECD TG475: OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (ОЭСР руководство №475 «Метод оценки хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих») [11]. Одновременно необходимо отметить, что данный тест относится к стандартным методам, которые включены в перечень рекомендуемых Всемирной организацией здравоохранения тестов для определения мутагенности и канцерогенности химических веществ.

Для исследований цитогенетического эффекта нанокompозита пектин-Ag использовали костный мозг и селезенку. Известно, что костный мозг и селезенка отличаются своей чувствительностью к ДНК-повреждающему воздействию известных и вновь изучаемых веществ и их смесей из-за гетерогенности клеточных популяций, когда уровень клеток с апоптозом и aberrациями может различаться для разных клеточных субпопуляций. Кроветворные клетки костного мозга являются популяцией недифференцированных быстро делящихся клеток, а в селезенке находятся лимфоцитарные клетки на различных стадиях дифференциации. Таким образом, цитогенетический анализ проводился с учетом различных субпопуляций клеток.

Экспериментальные группы были сформированы методом случайного отбора. Количество животных в группе – 6 (по 3 самки и 3 самца). В эксперимент были взяты 3 группы животных (1 опытная и 2 контрольные (положительный и отрицательный)).

Животных опытной группы подвергали ежедневному внутрижелудочному введению гидрозоль нанокompозита пектин-Ag в максимально рекомендуемой дозе – 2000 мг/кг/день на протяжении 4 суток, через 24 часа после последнего введения образца животным вводили внутрибрюшинно колхицин (2,5 мг/кг), блокирующий митоз на стадии метафазы. Умерщвление животных проводили по истечении 2 часов с момента введения колхицина.

Животным группы отрицательного контроля внутрижелудочно вводили пектин, доза и кратность были аналогичны опытной группе. Животным группы положительного контроля на 3-е сутки эксперимента вводили однократно внутрибрюшинно циклофосфамид в дозе 50 мг/кг. В положительном контроле процент aberrантных метафаз в костном мозге составил $11,08 \pm 1,04$, что указывает на чувствительность животных к цитогенетическому (в т.ч. мутагенному) воздействию.

Для цитогенетического анализа готовили препараты метафаз костного мозга и селезенки с помощью стандартного методического приема, выдерживая клетки в гипотоническом растворе хлористого калия с концентрацией 0,56% в течение 30 мин. Гипотоническая обработка клеточного биоптата создает достаточный для цитогенетического анализа разброс хромосом и фрагментов хроматина в апоптотических клетках, но не оказывает влияния на их формирование. Далее клетки центрифугировали, диспергировали и фиксировали троекратно смесью этилового спирта и уксусной кислоты в соотношении 3:1. Клеточную суспензию наносили капельно на предметные стекла и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Учет хромосомных aberrаций проводили на световом микроскопе

Leica DM2500 при увеличении в 1000 раз. На метафазных пластинках учитывались структурные aberrации хромосом без учета гепов (gaps). В связи с тем, что aberrации хромосом в контрольной и опытной группе с пектином были представлены только одиночными хроматидными фрагментами, спектр и среднее число aberrаций на метафазу в клетках костного мозга и селезенки не приводятся.

В цитологических препаратах костного мозга и селезенки кроме aberrантных хромосом проводили учет числа клеток с признаками повреждений и гибели в виде апоптоза и «митотических катастроф», которые принято определять в качестве маркеров цитогенной активности (мутагенеза) в других цитогенетических тестах, например в микроядерном тесте [12].

Полученные результаты исследований подвергались статистической обработке с использованием программы STATISTICA версия 7.0, проверка нулевой гипотезы проводилась с помощью F-критерия Фишера при уровне вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Использование полимерной оболочки на НЧ Ag может приводить не только к повышению их агрегационной стабильности, но и является одним из путей снижения их токсичности [13]. Исследуемые НЧ Ag⁰ были синтезированы в соответствии с принципами «зеленой» химии путем восстановления катионов серебра в водных средах пектином, макромолекулы которого одновременно выступают в качестве стабилизатора образующихся наночастиц за счет формирования на их поверхности биополимерной оболочки.

На спектре поглощения синтезированного гидрозоля нанокompозита пектин-Ag имеется пик с максимумом поглощения 412 нм, который соответствует пику поверхностного плазмонного резонанса (ППР) НЧ Ag и подтверждает их формирование (рис. 1). Известно, что длина волны максимума пика ППР НЧ Ag коррелирует с их диаметром [14]. Размер нанокompозита пектин-Ag, оцененный на основании положения максимума поглощения синтезированных гидрозолей, составляет ~20-30 нм.

С помощью атомно-адсорбционной спектроскопии установлено, что доля катионов серебра, которые провзаимодействовали с пектином, составляет 97%. При этом концентрация НЧ Ag в синтезированном гидрозоле составила 1,45 ммоль/л.

Согласно данным просвечивающей электронной микроскопии (рис. 2), синтезированные методом «зеленой» химии наночастицы пектин-Ag обладают сферической формой, а их средний диаметр составляет 13 ± 7 нм. При этом, согласно диаграмме распределения, более 90% частиц имеют диаметр менее 20 нм (рис. 3а). Следует отметить, что средний гидродинамический диаметр частиц пектин-Ag в гидрозоле на порядок превышает данные, полученные на просвечивающем электронном микроскопе, и составляет 255 ± 14 нм. Так как величина гидродинамического диаметра дает информацию о размере НЧ Ag вместе с гидратированной оболочкой на их поверхности, то эти данные еще раз подтверждают, что синтезированный нанокompозит представляет собой металлическое ядро, покрытое оболочкой полисахарида. Согласно данным динамического рассеяния света, в водной среде частицы нанокompозита пектин-Ag также однородны по размерам (индекс полидисперсности = 0,165) и более 80% частиц имеет гидродинамический диаметр в диапазоне 190-390 нм (рис. 3б).

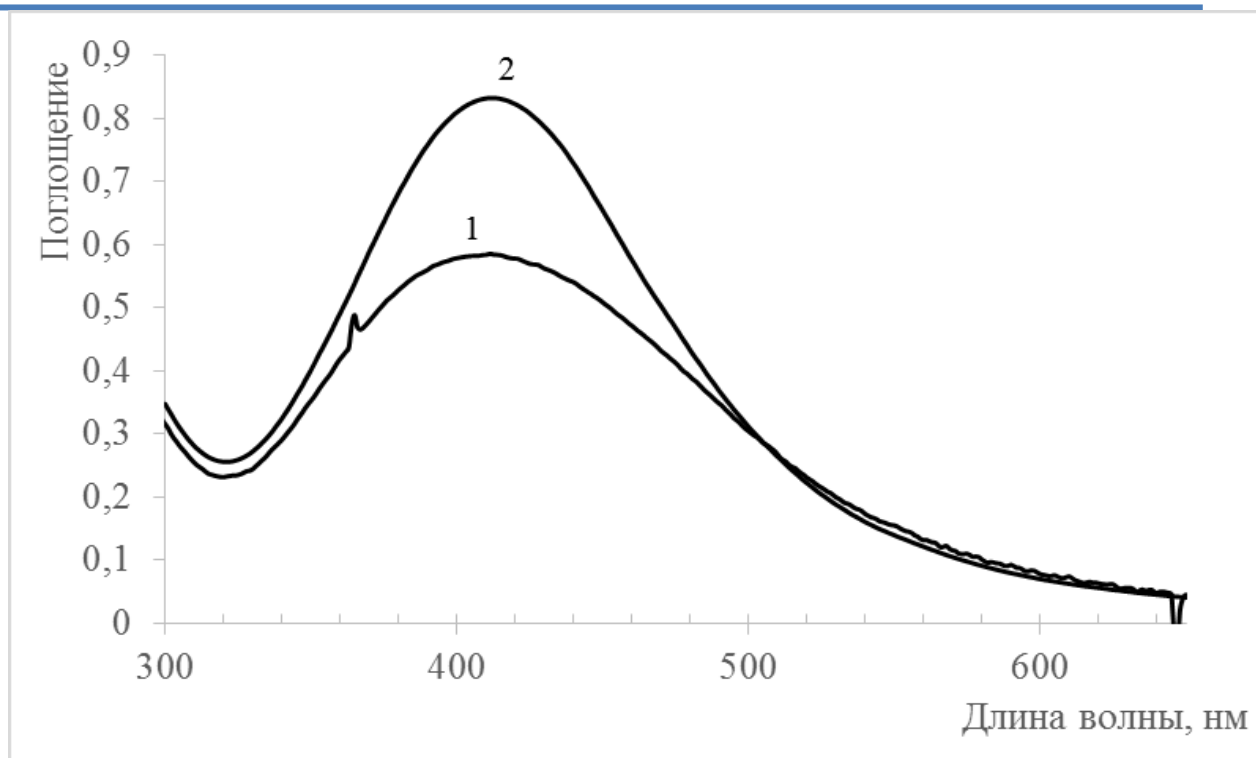


Рис. 1. Спектр поглощения гидрозоля наночастиц пектин-Ag: исходный (1) и через 6 месяцев хранения (2)

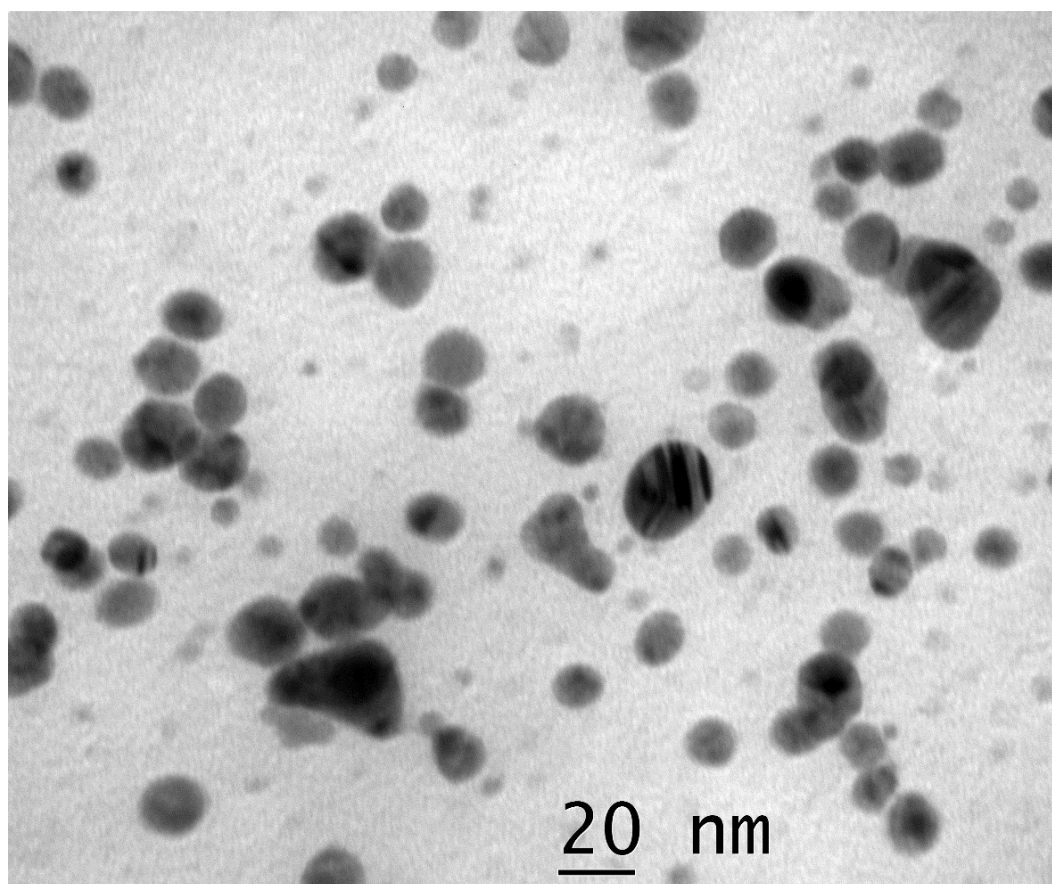


Рис. 2. ПЭМ-изображение наночастиц пектин-Ag

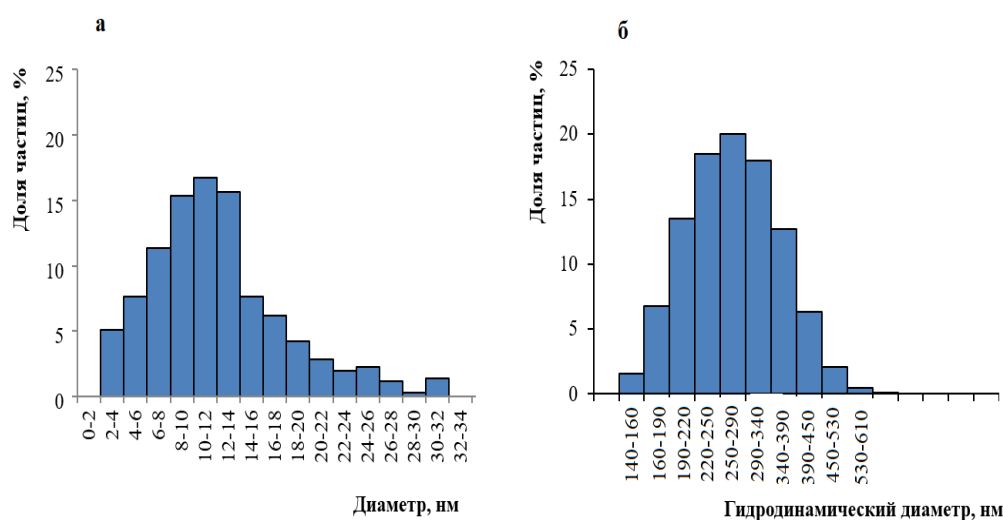


Рис. 3. Распределение наночастиц пектин-Ag по размерам, согласно данным ПЭМ (а) и по гидродинамическому диаметру (б)

Важной характеристикой коллоидных растворов серебра является их агрегационная устойчивость при хранении, так как изменение во времени размеров частиц может приводить как к снижению их антибактериальных свойств, так и изменению токсичности. Так, величина ξ -потенциала синтезированных частиц нанокompозита пектин-Ag составляет $-45,3 \pm 0,7$ мВ и свидетельствует об их высокой агрегативной устойчивости. Следовательно, синтезированные нанокompозиты, которые представляют собой НЧ Ag, стабилизированные оболочкой отрицательно заряженного полисахарида пектина, должны являться агрегативно-стабильными и сохранять свои физико-химические характеристики во времени. Установлено, что при хранении гидрозолей пектин-Ag в течение 6 месяцев при комнатной температуре в темноте седиментации наночастиц, образования агрегатов или осадка не происходит. При этом ξ -потенциал частиц через 6 месяцев после синтеза практически не меняется и составляет $-47,7 \pm 3,2$ мВ. Сдвига максимума пика поверхностного плазмонного резонанса НЧ Ag в спектре поглощения гидрозолей также не наблюдается ($\lambda_{\max} = 412$ нм), однако происходит увеличение интенсивности поглощения в $\sim 1,4$ раза (рис. 1). Это может быть связано с тем, что, по-видимому, часть Ag^+ была закреплена на макромолекулах пектина и в процессе хранения происходит их медленное восстановление под действием боковых цепей пектина (арабинанов и галактанов), содержащих гидроксильные группы с восстанавливающими свойствами. Эти данные хорошо согласуются с результатами [2, 13], согласно которым при хранении коллоидных растворов серебра может наблюдаться увеличение интенсивности поглощения. При этом следует отметить, что доля регистрируемых в растворе свободных катионов серебра через 6 месяцев хранения составила менее 6%.

Полученные данные, характеризующие цитогенетические изменения в клетках селезенки и костного мозга подопытных животных на стадии метафазы митоза при воздействии нанокompозита пектин-Ag количественно представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Результаты цитогенетического анализа клеток костного мозга и селезенки при
воздействии нанокompозита пектин-Ag**

Вид клеток	Группа животных	Частота встречаемости клеток с апоптозом на 100 метафаз	Частота встречаемости клеток с митотической гибелью на 100 метафаз	Частота встречаемости клеток с абберациями на 100 метафаз
Клетки селезенки	Опыт	33	2	1
	Контроль	1	0	0
Клетки костного мозга	Опыт	2	0	1,4
	Контроль	0	0	0

В проведенном эксперименте *in vivo* не было выявлено значимых различий между количеством аббераций хромосом в костном мозге и селезенке в опытной группе в сравнении с контрольной: $1,40 \pm 0,53\%$ (7 абберантных клеток на 500 метафаз) в костном мозге и $1,00 \pm 0,45\%$ (5 абберантных клеток на 500 метафаз) в селезенке, что было близко к спонтанному уровню. По данным литературы, спонтанная частота клеток с хромосомными повреждениями в костном мозге составляет 1,0-2,5%, аналогичный показатель для клеток селезенки в 2-3 раза ниже [14].

В селезенке, в отличие от аналогичной картины в костном мозге и контроле, установлено увеличение клеток с признаками апоптоза (рис. 4) и наличие гибели клеток на стадии митоза, которая сопровождается образованием апоптических телец, позволяющих утверждать, что данные цитогенетические изменения можно классифицировать как «митотические катастрофы» (рис. 5). «Митотическая катастрофа» рассматривается как сложный защитный молекулярный механизм гибели соматических клеток, предотвращающий анеуплоидизацию и снижающий риск их малигнизации. Вместе с тем не исключается роль фрагментации митотических хромосом в дальнейшей малигнизации индуцированных или спонтанно возникающих опухолевых клеток [15].

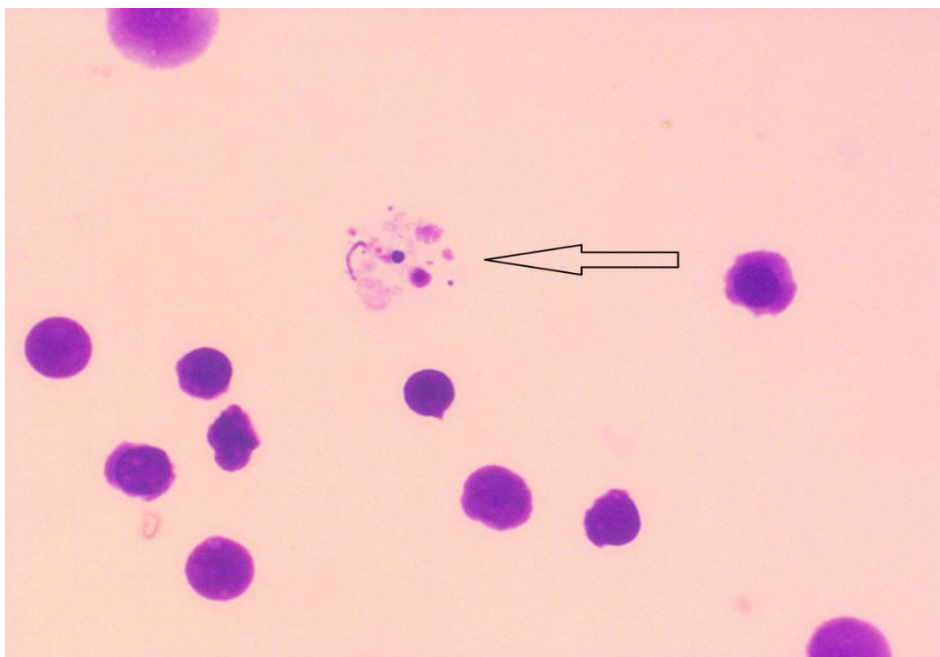


Рис. 4. Клетки селезенки с признаками апоптоза при воздействии нанокompозита пектин-Ag

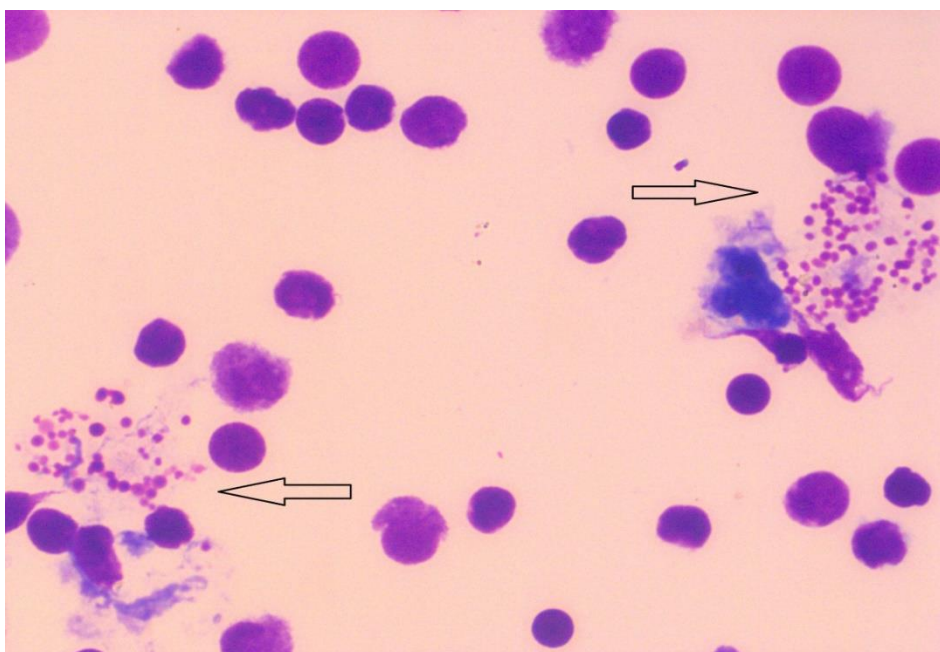


Рис. 5. Погибшие клетки селезенки («митотические катастрофы») при воздействии нанокompозита пектин-Ag

Заключение. Нанокompозит пектин-Ag, стабилизированный биосовместимым природным полимером – пектином, не вызывает увеличения спонтанного уровня индукции хромосомных aberrаций в клетках костного мозга и селезенки аутбредных крыс при тестировании согласно рекомендациям OECD TG 475 [11]. Одновременно с этим в селезенке установлено увеличение клеток с признаками апоптоза и наличие «митотических катастроф», что свидетельствует об усилении митотической активности клеток и пролиферации клеток.

Список литературы:

1. Gmoshinski, I.V., Shipelin, V.A., Khotimchenko, S.A., Nanomaterials in food products and their package: comparative analysis of risks and advantages, *Analiz riska zdorov'yu (Health Risk Analysis)*, vol. 4: 134–138. (in Russ.). doi org/10.21668/health.risk/2018.4.16.
2. Hileuskaya, K., Ladutska, A., Kulikouskaya, V., Kraskouski, A., Novik, G., Kozerozhets, I., Kozlovskiy, A., Agabekov, A., 'Green' approach for obtaining stable pectin-capped silver nanoparticles: physico-chemical characterization and antibacterial activity, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2020, vol. 585, article 124141.
3. Hartemann, P., Hoet, P., Proykova A., Fernandes, T., Baun, A., De Jong, W., Filser, J., Hensten, A., Kneuer, C., Maillard, J., Norppa, H., Scheringer, M., Wijnhoven, S., Nanosilver: Safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance, *Materials Today*, 2015, vol. 18, no. 3, pp. 122-123.
4. Tiwari, D.K., Takashi, J., Behari, J., Dose-dependent *in-vivo* toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2011, vol. 21 no.1, pp. 13–24. doi 10.3109/15376516.2010.529184.
5. Kim, Y.S, Kim, J.S, Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D, Choi, B.S., Lim, R, Chang, H.K., Chung, Y.H., Kwon, I.H., Jeong, J., Han, B.S., Yu, I.J., Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats, *Inhalation Toxicol.*, 2008, vol. 20, pp. 575-583.
6. Kim, J.S., Sung, J. H., Ji, J. H., Song, K. S., Lee, J. H., Kang, C. S., Yu, J. J., *In vivo* Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure, *Saf. Health Work*, 2011, Vol. 2, no. 1, pp.34-41.
7. Nymark, P, Catalán, J, Suhonen, S, Järventausta, H, Birkedal, R, Clausen, P.A, Jensen, K.A, Vippola, M., Savolainen, K., Norppa, H., Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells, *Toxicology*, 2013, vol. 313, no. 1, pp. 38-48. doi org/10.1016/j.tox.2012.09.014.
8. Кирбик Б.С., Тихомирова С.В., Биткин И.А., Песня Д.С. Исследование мутагенной и митозмодифицирующей активности НЧ Ag в эксперименте. *Туберкулез и болезни легких*. 2015;(4):54-57. <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2015-0-4-54-57>
9. Akter, M., Sikder, Md. T., Rahman, Md. M., Ullah, A.K.M.A., Hossain, K.F.B., Banik, S., Hosokawa. T., Saito, T., Kurasaki, M., A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives, *Journal of Advanced Research*, 2018, vol. 9, pp. 1-16.
10. OECD, *Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test*, 2014, doi org/10.1787/9789264224407-en.
11. Fenech, M. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Research*, 2003. vol.534, no.1, pp.65–75.
12. Al-Muhanna, M. K., K.S., Hileuskaya, V. I., Kulikouskaya, A. N., Kraskouski, V. E., Agabekov, Preparation of stable sols of silver nanoparticles in aqueous pectin solutions and properties of the sols, *Colloid journal*, 2015, vol. 77, no. 6, pp. 677-685.

13. Pinto, V.V., José, M., Silva, R., Santos, H.A., Silva, F., Pereira, C.M., Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium : Effect of the synthesis and storage conditions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2010, vol. 364, pp. 19–25.
14. Moore. F. R., Urda. G. A., Krishna, G, Theiss, J. C., An in Vivo/in Vitro Method for Assessing Micronucleus and Chromosome Aberration Induction in Rat Bone Marrow and Spleen. 1. Studies With Cyclophosphamide, *Mutat. Res.* 1995, vol. 335, no. 2, pp. 191-200.
15. Deev, R. V.. Bilyalov, A. I., Zhampeisov, T. M., Modern concepts of cell death, *Genes & Cells*, vol. 13, no. 1, pp. 6-19.

References:

1. Gmoshinski, I.V., Shipelin, V.A., Khotimchenko, S.A., Nanomaterials in food products and their package: comparative analysis of risks and advantages, *Analiz riska zdorov'yu (Health Risk Analysis)*, vol. 4, 134–138. (in Russ.). doi org/10.21668/health.risk/2018.4.16.
2. Hileuskaya, K., Ladutska, A., Kulikouskaya, V., Kraskouski, A., Novik, G., Kozerozhets, I., Kozlovskiy, A., Agabekov, A., 'Green' approach for obtaining stable pectin-capped silver nanoparticles: physico-chemical characterization and antibacterial activity, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2020, vol. 585, article 124141.
3. Hartemann, P., Hoet, P., Proykova A., Fernandes, T., Baun, A., De Jong, W., Filser, J., Hensten, A., Kneuer, C., Maillard, J., Norppa, H., Scheringer, M., Wijnhoven, S., Nanosilver: Safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance, *Materials Today*, 2015, vol. 18, no. 3, pp. 122-123.
4. Tiwari, D.K., Takashi, J., Behari, J., Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2011, vol. 21 no.1, pp. 13–24. doi 10.3109/15376516.2010.529184.
5. Kim, Y.S, Kim, J.S, Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D, Choi, B.S., Lim, R, Chang, H.K., Chung, Y.H., Kwon, I.H., Jeong, J., Han, B.S., Yu, I.J., Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats, *Inhalation Toxicol.*, 2008, vol. 20, pp. 575-583.
6. Kim, J.S., Sung, J. H., Ji, J. H., Song, K. S., Lee, J. H., Kang, C. S., Yu, J. J., In vivo Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure, *Saf. Health Work*, 2011, Vol. 2, no. 1, pp.34-41.
7. Nymark, P, Catalán, J, Suhonen, S, Järventaus, H, Birkedal, R, Clausen, P.A, Jensen, K.A, Vippola, M., Savolainen, K., Norppa, H., Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells, *Toxicology*, 2013, vol. 313, no. 1, pp. 38-48. doi org/10.1016/j.tox.2012.09.014.
8. Kirbik, B.S., Tikhomirova, S.V., Bitkin, I.A., Pesnya, D.S., Experimental study of mutagenous and mitosis modifying activity of silver nanoparticles, *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2015, vol. 4, pp. 54-57 (In Russ.) doi org/10.21292/2075-1230-2015-0-4-54-57.
9. Akter, M., Sikder, Md. T., Rahman, Md. M., Ullah, A.K.M.A., Hossain, K.F.B., Banik, S., Hosokawa. T., Saito, T., Kurasaki, M., A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*, 2018, vol. 9, pp. 1-16.

10. OECD, Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, 2014, doi org/10.1787/9789264224407-en.
11. Fenech, M. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, Mutation Research, 2003. vol.534, no.1, pp.65–75.
12. Al-Muhanna, M. K., K.S., Hileuskaya, V. I., Kulikouskaya, A. N., Kraskouski, V. E., Agabekov. Preparation of stable sols of silver nanoparticles in aqueous pectin solutions and properties of the sols, Colloid journal, 2015, vol. 77, no. 6, pp. 677-685.
13. Pinto, V.V., José, M., Silva, R., Santos, H.A., Silva, F., Pereira, C.M., Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium : Effect of the synthesis and storage conditions, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp., 2010, vol. 364, pp. 19–25.
14. Moore. F. R., Urda. G. A., Krishna, G, Theiss, J. C., An in Vivo/in Vitro Method for Assessing Micronucleus and Chromosome Aberration Induction in Rat Bone Marrow and Spleen. 1. Studies With Cyclophosphamide, Mutat. Res..1995, vol. 335, no. 2, pp. 191-200.
15. Deev, R. V., Bilyalov, A. I., Zhampeisov, T. M. Modern concepts of cell death. Genes & Cells, vol. 13, no. 1, pp. 6-19.

Поступила/Received: 11.05.2021

Принята в печать/Accepted: 25.05.2021.