

hirskokarpatskoyi porody za umov pidvyshchenoho rivnya sirky i yodu u yikh ratsionakh [The content of thyroid hormones in the blood of mountain karpathian sheep under the high level of sulfur and iodine in their diets]. *Nauk.-tekhn. byul. Instytutu biolohiyi tvaryn i DNDKI*

vetpreparativ ta kormovykh dobavok — Scientific and technical bulletin of institute of animal biology and state scientific research control institute of veterinary medical products and fodder additives, 2011, № 1, S. 168–173 (in Ukrainian).

УДК 620.3: 591.16:611.013.1:611.013.2

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА НА ГАМЕТИ КРОЛІВ *IN VITRO* ТА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VIVO*

В. Я. Сирватка, Ю. І. Сливчук, І. І. Розгоні, І. І. Гевкан
vasyl.syrvatka@gmail.com

Інститут біології тварин НААН, Україна, 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38

Метою дослідження було вивчення впливу наночастинок срібла на гамети кролів *in vitro* і ефективність запліднення *in vivo*.

Для дослідження використовували комерційно доступні наночастишки срібла (синтезовані електрохімічним методом) і наночастишки, синтезовані за допомогою хімічного відновлення. Вивчали вплив різних концентрацій наночастинок срібла (0, 0,01, 0,1, 1 і 10 мкг/мл) в культуральному середовищі на дозрівання яйцеклітин кролематок при співкультивуванні з клітинами гранульози, життєздатність і рухливість спермій протягом 72 годин зберігання при 15 °С, ефективність штучного запліднення за умов додавання до розбавника сперми 0,1 мкг/мл наночастинок срібла.

Встановлено, що наночастишки срібла в концентрації від 0,01 до 10 мкг/мл не проявляли негативного впливу на дозрівання ооцитів в умовах *in vitro*. Концентрація 10 мкг/мл призводила до зниження життєздатності

клітин гранульози і зміни біохімічних показників кондиційного середовища. Не виявлено негативної дії наночастинок срібла в концентрації від 0,01 до 1 мкг/мл на спермії кролів. Однак, концентрація 10 мкг/мл наночастинок срібла в розбавнику призводить до зниження рухливості спермій протягом 72 годин зберігання. Додавання 0,1 мкг/мл наночастинок срібла до розбавника сперми не спричинило негативної дії на ефективність запліднення кролиць і кількість новонароджених кроленят на одну самку.

Зроблено висновок, що концентрації наночастинок срібла понад 1 мкг/мл є потенційно токсичні на репродуктивну функцію тварин.

Ключові слова: НАНОЧАСТИНКИ СРІБЛА, КРОЛІ, ООЦИТИ, СПЕРМІЇ, ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VIVO*

EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON RABBIT'S GAMETES *IN VITRO* AND FERTILIZATION PROCESSES *IN VIVO*

V. J. Syrvatka, Y. I. Slyvchuk, I. I. Rozgoni, I. I. Gevkan
vasyl.syrvatka@gmail.com

Institute of Animal Biology NAAS; 38 V. Stus St, Lviv, 79034, Ukraine

The aim of the study was to investigate the influence of silver nanoparticles on rabbit's gametes *in vitro* and fertilization processes *in vivo*.

For this purpose, we used a commercially available silver nanoparticles (synthesized by electrochemical method) and nanoparticles

synthesized in laboratory via chemical reduction. We studied the effect of different concentrations of silver nanoparticles (0, 0.01, 0.1, 1, and 10 mg/ml) in culture medium on rabbit's oocytes maturation co-cultured with granulosa cells and on sperm viability and motility during 72 hours of storage at 15 °C. The efficiency of artificial insemination in presence of silver nanoparticles in sperm extender at concentration of 0.1 mg/ml was determined for study of their effect on the fertilization process in vivo.

It was revealed, that silver nanoparticles at the concentration of 0.01 to 10 µg/ml had no negative impact on the maturation of oocytes in vitro. However, in concentration 10 µg/ml silver nanoparticles caused a decrease in viability of granulosa cells and change in biochemical parameters of conditioned medium. The results showed that silver nanoparticles at the

concentration of 0.01 to 1 µg/ml did not influenced upon rabbit's sperm motility and viability. Nevertheless, presence of silver nanoparticles in sperm extender at a concentration of 10 µg/ml led to reduction of sperm motility and viability during 72 hours of storage. The concentration of silver nanoparticles 0.1 µg/ml in a semen extender had no influence on the number of pregnant rabbits and newborn per doe.

Thus, concentration of 1 µg/ml of silver nanoparticles is critical, increases of this concentration are potentially toxic on animal's reproductive system.

Key words: SILVER NANOPARTICLES, RABBITS, OOCYTES, SPERMATOZOA, FERTILITY *IN VIVO*

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ГАМЕТЫ КРОЛЬЧИХ *IN VITRO* И ПРОЦЕСС ОПЛОДОТВОРЕНИЯ *IV VIVO*

В. Я. Сырватка, Ю. І. Сливчук, І. І. Розгони, І. І. Гевкан
vasyl.syrvatka@gmail.com

Институт биологии животных НААН, Украина, 79034, г. Львов, ул. В. Стуса, 38

Целью исследования было изучение влияния наночастиц серебра на гаметы кроликов in vitro и процессы оплодотворения in vivo.

Для этой цели мы использовали коммерчески доступные наночастицы серебра (синтезированные электрохимическим методом) и наночастицы, синтезированные нами с помощью химического восстановления. Мы изучали влияние различных концентраций наночастиц серебра (0, 0.01, 0.1, 1 и 10 мкг/мл) в культуральной среде на созревание яйцеклеток кроликов при условиях совместного культивирования с клетками гранулезы и на жизнеспособность и подвижность сперматозоидов в течение 72-х часов хранения при 15 °C. Также, исследовали эффективность искусственного оплодотворения в условиях добавления к разбавителю спермы 0,1 мкг/мл наночастиц серебра.

Установлено, что наночастицы серебра в концентрации от 0,01 до 10 мкг/мл не проявили негативного влияния на созревание ооцитов в условиях in vitro. Однако, концентрация 10 мкг/мл приводила к уменьшению жизнеспособности клеток

гранулезы и изменения некоторых биохимических показателей кондиционной среды. Результаты показали, что наночастицы серебра в концентрации от 0,01 до 1 мкг/мл индифферентны сперматозоидам кроликов. Тем не менее, концентрация 10 мкг/мл наночастиц серебра в разбавителе приводит к снижению подвижности и жизнеспособности сперматозоидов в течение 72 часов хранения. Добавление 0,1 мкг/мл наночастиц серебра в разбавитель спермы не повлекло негативного воздействия на количество беременных крольчих и новорожденных крольчат на одну самку.

Следовательно, концентрация 1 мкг/мл наночастиц серебра является предельной, а увеличение этой концентрации может иметь потенциально токсическое действие на воспроизводительную способность животных.

Ключевые слова: НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА, КРОЛИКИ, ООЦИТЫ, СПЕРМИИ, ОПЛОДОТВОРЕНИЯ *IN VIVO*

Нанотехнологія відносно нова наука, проте, її продукти уже знаходять практичне застосування в різних сферах досліджень і в повсякденному житті [1]. Особливий інтерес викликає синтез нанорозмірних частинок із заданими фізичними і хімічними властивостями в розробці нових лікарських препаратів. Створення нового продукту із активним діючим агентом та ефективною системою доставки, який би максимізував летальний ефект для бактерій і зводив до мінімуму негативний вплив на організми тварин та людей, має важливе прикладне та теоретичне значення в репродуктивній біотехнології, медицині та ветеринарії. Найперспективнішими продуктами нанотехнології є наночастинки срібла, так як вони володіють яскраво вираженими бактерицидними [2], фунгіцидними [3] та віруцидними [4] властивостями. Крім того, унікальні фізичні, хімічні та біологічні властивості наночастинок срібла відкривають широкі перспективи використання їх в діагностиці [5], в якості біомолекулярних міток, а також в терапії раку [6] та вірусу імунodefіциту людини [4].

Терапевтичне та діагностичне застосування цих наночастинок гальмується недостатністю інформації про їх механізми впливу на організм тварин та людини на клітинному та молекулярному рівнях. Кілька публікацій присвячені вивченню впливу наночастинок срібла на соматичні культури клітин та загального впливу на організм тварин [7, 8]. Однак, невідомими залишаються аспекти токсикологічного впливу на репродуктивну систему, гамети та процеси запліднення у тварин. Тому, метою роботи було вивчити вплив наночастинок срібла на спермії та ооцити кролів *in vitro* та процеси запліднення *in vivo*.

Матеріали і методи

На сучасному етапі розвитку нанотехнології існують декілька підходів для синтезу наночастинок срібла, зокрема:

електрохімічний, термічний розклад, лазерна абляція, мікрохвильове опромінення, хімічний і біологічний синтез [9, 10]. У своїй роботі ми використовували комерційні наночастинки синтезовані електрохімічним методом та порівняли їх із наночастинками, отриманими за допомогою хімічної редукції.

Для синтезу наночастинок срібла використовували хімічні реактиви виробництва SigmaAldrich (США). Для виконання досліджень в лабораторії репродуктивної біотехнології та розведення тварин було синтезовано наночастинки срібла, розміром 10–12 нм, шляхом хімічної редукції водного розчину AgNO_3 [9]. В якості редукційного агенту використовували натрій борогідрид, а як стабілізуючі речовини — бичачий сироватковий альбумін (BSA) та полівінілпіролідон (PVP). Крім того, в досліді використовували комерційно доступні наночастинки срібла виробництва NSP(США), синтезовані електрохімічним методом, розміром 5–10 нм.

Ооцит-кумуляусні комплекси (ОКК) та клітини гранульози для проведення досліджень отримували методом аспірації антральних фолікулів із яєчників забитих на бойні кролематок новозеландської білої породи. Яйцеклітини відмінної та доброї якості, після відмивання від фолікулярної рідини, розділяли на 5 дослідних груп (по 20 ОКК у кожній) та додавали клітини гранульози в концентрації 1×10^6 клітин/мл. Дослідні групи відрізнялись різними концентраціями наночастинок срібла в культуральному середовищі — без наночастинок срібла; 0,01; 0,1; 1 та 10 мкг/мл.

Культивування проводили в основному середовищі 199 (Applichem, Німеччина), з додаванням 10 % фетальної сироватки корів (ПанЕко, Росія); 5 мкг/мл фолікулостимулюючого гормону (Sigma, США); 50 мкг/мл лютеїнізуючого гормону (Sigma, США) за температури 38° С та максимальній вологості в середовищі з 5 % CO_2 . Після 24 годин культивування проводили морфологічну оцінку якості

ОКК — за наявності полярного тільця після їх фарбування барвником Гімза (Sigma, США) та підрахунок життєздатних клітин гранульози після фарбування їх трипановим синім (Sigma, США). Було відібрано зразки кондиційного середовища для визначення окремих біохімічних показників: концентрації прогестерону за допомогою комерційного набору DRG (Німеччина), активності лактатдегідрогенази та концентрації кальцію — за допомогою наборів Humman (Німеччина).

Вивчення впливу наночастинок срібла на активність та виживання спермійв кролів було проведено в умовах дослідів *in vitro* з використанням свіжоотриманої сперми самців кролів новозеландської білої породи. В якості розбавника використовували тріс-ацетат-глюкозний буфер з додаванням наночастинок срібла фірми NSP у концентраціях 0; 0,01; 0,1; 1; та 10 мкг/мл.

Для вивчення впливу наночастинок срібла на процеси запліднення *in vivo* було використано 14 статевозрілих кролиць породи новозеландська біла, вагою 4–4,5 кг. Тварин поділили на дві дослідні групи: кролиць контрольної та дослідної групи осіменяли свіжоотриманою спермою кролів у концентрації 10^7 спермійв/0,5мл/самку. В якості розбавника сперми використовували

тріс-цитрат-глюкозний буфер (pH 6,9). До розбавника сперми, якою осіменяли самок дослідної групи, вносили наночастинок срібла в кількості 0,1 мкг/мл. Овуляцію індукували аналогом гонадотропін-рилізінг гормону 0,2 мл (Фертагіл, Інтервет, Голландія). Через 15 діб після запліднення проводили обстеження кролематок для визначення кількості плодів.

Результати й обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що всі досліджувані концентрації наночастинок срібла від 0,01 до 10 мкг/мл не позначалися на дозріванні яйцеклітин (рис. 1 А). Не встановлено вірогідної різниці між контрольною та дослідними групами і в кількості ооцитів дозрілих до метафази-2. Також встановлено, що концентрації наночастинок срібла у середовищі для співкультивування ОКК від 0,01 до 1 мкг/мл не призводять до зменшення числа життєздатних клітин гранульози. Концентрація 10 мкг/мл наночастинок срібла в середовищі як комерційного, так і синтезованого нами, спричиняє зниження проліферативної активності клітин гранульози після 24 годин культивування (рис. 1 Б).

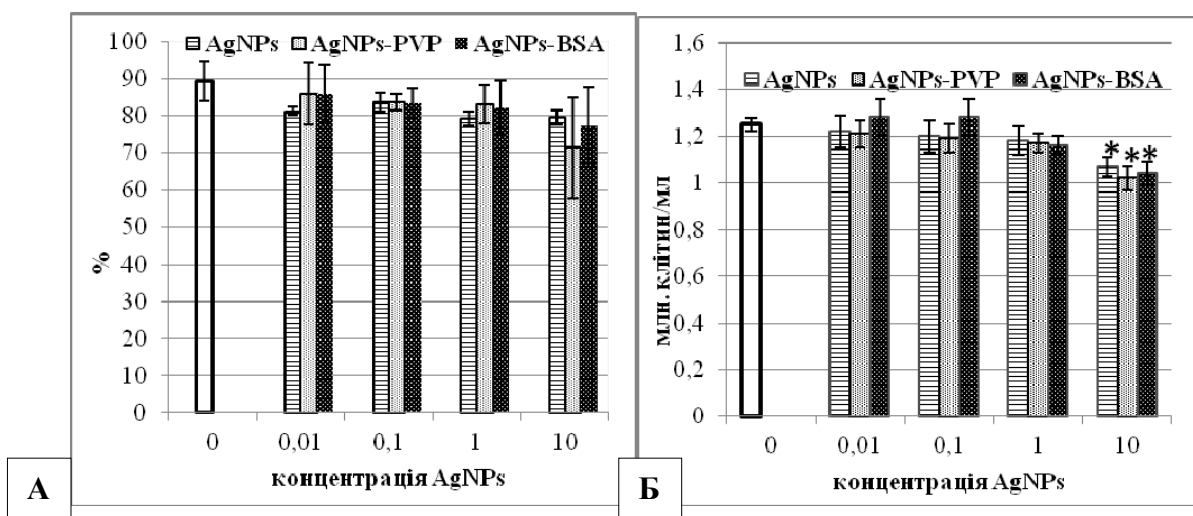


Рис. 1. Відсоток яйцеклітин дозрілих до метафази-2 (А) та концентрація живих клітин гранульози (Б) після 24 годин культивування.

Примітка: * — $p < 0,05$

Зниження життєздатності клітин гранульози після 24 годин культивування в дослідній групі із концентрацією наночастинок срібла в кондиційному середовищі 10 мкг/мл підтверджувалось підвищенням активності лактатдегідрогенази. Активність лактатдегідрогенази в кондиційному середовищі вірогідно ($p < 0,05$) вища за відповідний показник контрольній групі. Проте, між 1, 2, 3-ю дослідною та

контрольною групами вірогідних різниць в активності лактатдегідрогенази не виявлено (рис. 2 А). Встановлено, що AgNPs, AgNPs-PVP та AgNPs-BSA в концентрації 10 мкг/мл вірогідно знижують концентрацію кальцію в кондиційному середовищі після 24 годин культивування (рис. 2 Б). Тоді, як при додаванні наночастинок срібла в концентраціях від 0 до 1 мкг/мл його вміст вірогідно не змінювався.

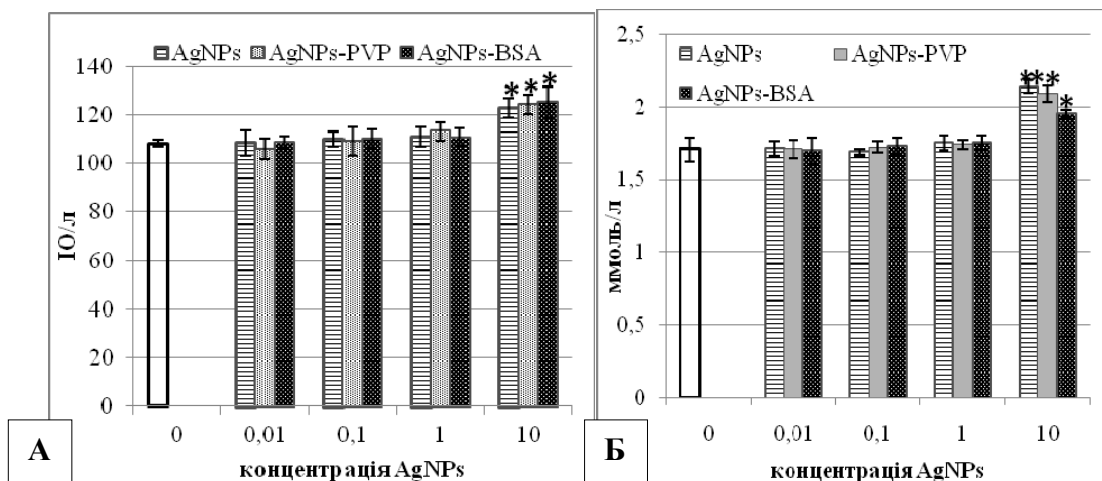


Рис. 2. Активність лактатдегідрогенази (А) та концентрація кальцію (Б) у культуральному середовищі після 24 годин культивування.

Примітка: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$

Встановлено, що додавання наночастинок срібла в досліджуваних концентраціях не позначалося на рівні прогестерону після 24 годин культивування у кондиційному середовищі контрольної та дослідних груп (рис. 3 А).

На рисунку 3 Б зображено яйцеклітину після 24 годин культивування *in vitro* із додавання наночастинок срібла в концентрації 10 мкг/мл. Добре помітне полярне тільце, що є індикатором дозрівання ооцитів до метафази-2 клітинного циклу.

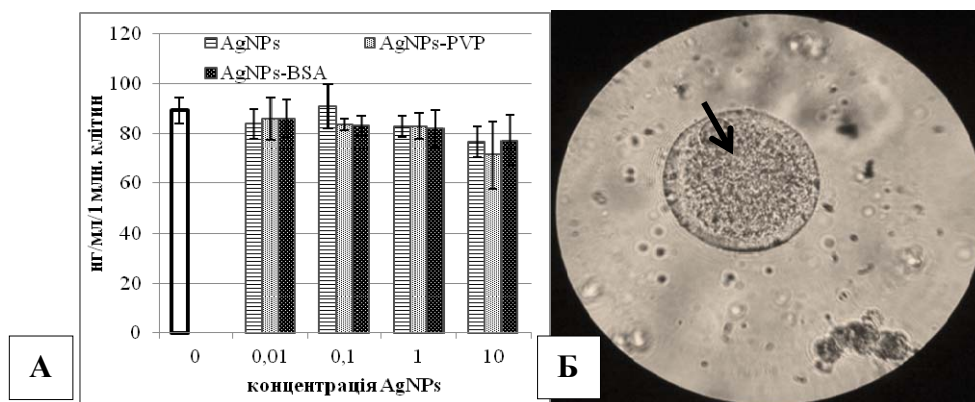


Рис. 3. Концентрація прогестерону в культуральному середовищі (А) та ооцит дозрілий до метафази-2 за дії наночастинок срібла в концентрації 10 мкг/мл (Б) після 24 годин культивування (стрілочкою показано полярне тільце — індикатор дозрівання ооцитів до метафази-2 клітинного циклу). Збільшення 40x10

Порівняльний аналіз впливу різних концентрацій наночастинок срібла в середовищі для розбавлення сперми на рухливість та відсоток живих спермійв впродовж культивування — одразу після розбавлення, через 24, 48 та 72 години за температури 15 °С відображений на рисунку 4. Встановлено, що дослідні групи наночастинок срібла в концентрації від 0,01 до 1 мкг/мл не проявляють негативного

впливу на рухливість та відсоток живих спермійв. Концентрація срібла 10 мкг/мл викликає вірогідне зменшення числа життєздатних спермійв і знижує їхню рухливість впродовж 72 годин зберігання. Після 48 годин культивування кількість життєздатних спермійв при концентрації AgNPs 10 мкг/мл зменшується до $32,74 \pm 2,60$ %, проти $54,88 \pm 1,54$ % у контролі.

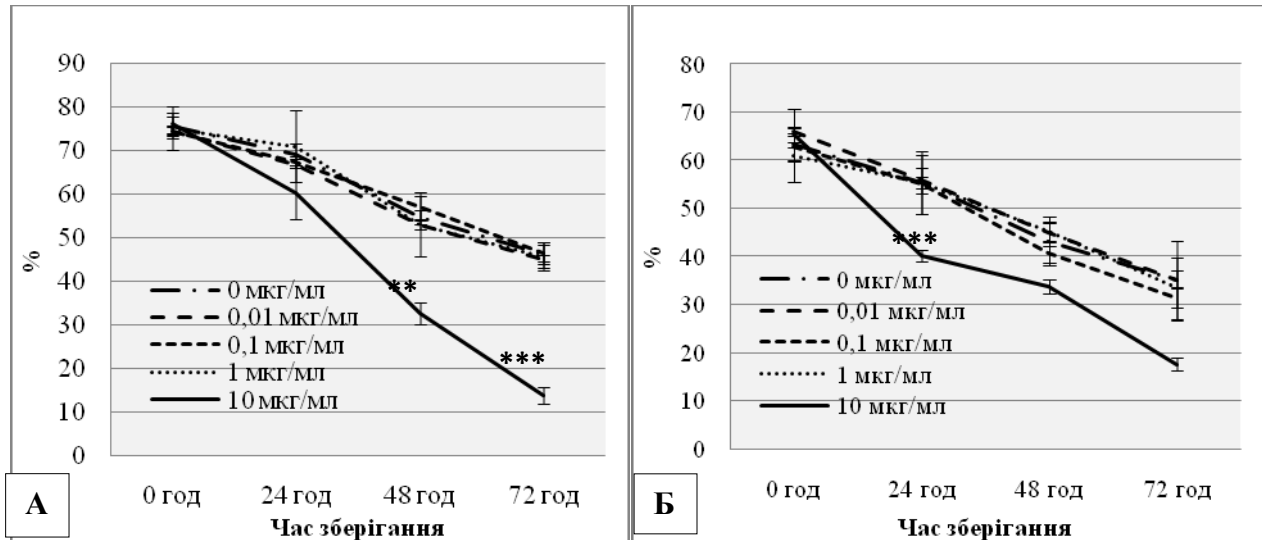


Рис. 4. Відсоток живих спермійв (А) та їх рухливість (Б) та (при різних концентраціях наночастинок срібла у розчиннику впродовж 72 годин зберігання при 15 °С ($M \pm m$, $n=3$)).

Примітка: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$

При вивченні запліднюючої здатності спермійв не виявлено вірогідних різниць між контрольною та дослідною

групою в кількості вагітних кролематок, плодів та новонароджених кроленят на кролематку (табл. 1).

Таблиця 1.

Запліднююча здатність спермійв при додаванні в розчинник 0,1 мкг/мл наночастинок срібла ($M \pm m$, $n=7$)

Дослідні групи	Кількість осімінених кролематок	Кількість сукрільних кролематок	Кількість плодів на кролематку	Кількість новонароджених
Контрольна	7	6 (85,71 %)	$5,83 \pm 0,60$	$5,50 \pm 0,67$
Дослідна	7	6 (85,71 %)	$5,67 \pm 0,71$	$5,50 \pm 0,85$

Концентрація наночастинок срібла 0,1 мкг/мл в розріджувачі сперми не викликає ембріональної смертності та не впливає на кількість сукрільних кролематок, співвідношення плодів та новонароджених кроленят на одну кролематку.

Наночастинки срібла є одним із найбільш широко поширених нанопродуктів щовикористовуються в різних галузях науки та виробництва. Однак, при вивченні впливу наночастинок золота на функціональну активність спермійв людини було виявлено 20 % зниження рухливості та їх фрагментацію

після 15 хв інкубації [11]. Аналогічні дані були отримані Taylor із співавторами на сперміях бугаїв після 2 годин інкубації при додаванні наночастинок золота розміром 5–65 нм у середовище [12]. Braydich-Stolle із співавторами виявили порушення Функціонального сигнального шляху та зниження проліферації в стовбурових клітинах сперматогоніїв миші C18-4 після 48 годин культивування за умов додавання в культуральне середовище 10–25 мкг/мл наночастинок срібла розміром 10–80 нм [13]. Результати є попередньою оцінкою впливу наночастинок срібла на репродуктивну систему тварин. Однак виявлено, що концентрація наночастинок срібла 10 мкг/мл у кондиційному середовищі є потенційно токсичною на спермії кролів і призводить до зменшення відсотка живих спермій та зниження їх рухливості впродовж 72 годин культивування.

Добре вивченими є механізми цитотоксичної дії наночастинок Ag на соматичні клітини тварин та людини [7, 8]. В основному негативний ефект залежно від дози, супроводжується окислювальним стресом, пошкодженням ДНК і модуляцією продукції цитокінів. Генерація активних форм кисню відбувається при порушенні транспорту іонів та електронів через мембрани мітохондрій наночастинами, що приводить до загибелі клітин через апоптоз або некроз [14]. Негативна дія наночастинок на ДНК здійснюється через вивільнення іонів срібла з її поверхні або ж безпосереднім впливом цілої наночастинок. Ahmed із співавторами на ембріональних клітинах та фібробластах миші встановили прямий та опосередкований вплив наночастинок срібла через збільшення експресії білків репарації ДНК (Rad51 і H2AX) і активацією p53 та чекпоінтних білків клітинного циклу [15]. У випадку із гаметами такі токсичні механізми можуть викликати генетичні мутації та вади розвитку в новому поколінні. У роботах Wu із співавторами встановлено, що наночастинок срібла в низьких дозах (LD50 = 1,03 мкг/мл) призводять до

морфологічних аномалій розвитку рибок Медаки японської [16]. Проте, при вивченні впливу на ембріони курей не виявлено відхилень в розвитку, але зафіксовано зменшення числа та розмірів лімфатичних фолікулів [17]. Проте дослідження токсикології наночастинок проведених на ембріонах риб і курей неможливо екстраполювати на організми ссавців, тому майбутні дослідження впливу наночастинок срібла на ембріони тварин є перспективними.

Не менш важливим при вивченні механізмів впливу наночастинок срібла на репродуктивну систему тварин є дослідження їх дії на продукцію оксиду азоту. В досліджах Rosas-Hernández із співавторами встановлено, що високі дози наночастинок срібла (100 мкг/мл) збільшували продукцію оксиду азоту в коронарних ендотеліальних клітинах щурів, що спонукало до активації їх проліферативної активності після 24 годин культивування. Однак, при більш низьких дозах (<10 мкг/мл), спостерігали зниження функції мітохондрій клітин [18]. Біологічна дія наночастинок срібла залежить від багатьох хімічних і фізичних властивостей: форми, розмірів, хімічного складу наночастинок, а також їхніх композитних речовини [19].

Висновки

Наночастинок срібла в концентрації від 0,01 до 1 мкг/мл не проявляли негативного впливу на дозрівання ооцитів та на рухливість і відсоток живих спермій *in vitro*, а також на процеси запліднення *in vivo*. Однак, підвищення концентрації до 10 мкг/мл зумовлює негативну дію на активність спермій кролів та життєздатність клітин гранульоци.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження будуть спрямовані на вивчення дії наночастинок срібла на ембріони раннього періоду розвитку тварин.

1. Galdiero S., Falanga A., Vitiello M., Cantisani M., Marra V., Galdiero M. Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. *Molecules*, 2011, vol. 16, pp. 8894–8918. doi:10.3390/molecules16108894.
2. Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Ramachandrarao P., Dash D. Characterization of enhanced anti-bacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 2007, vol. 18. doi:10.1088/0957-4484/18/22/225103.
3. Kim K.-J., Sung W. S., Moon S.-K., Choi J.-S., Kim J. G., Lee D. G. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, vol. 18, no. 8, pp. 1482–1484.
4. Humberto H. L., Nilda V. A.-N., Liliana I.-T., Cristina R.-P. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 2010, 8:1. Available at: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/1>.
5. Cao W., Huang T., Xu X.-H. N., Elsayed-Ali H. E. Localized surface plasma on resonance of single silver nanoparticles studied by dark-field optical microscopy and spectroscopy. *J. Appl. Phys.* 2011, vol. 109, 034310. Available at: <http://dx.doi.org/10.1063/1.3544349>.
6. Nallathamby P. D., Xu X. H. Study of Cytotoxic and Therapeutic Effects of Stable and Purified Silver Nanoparticles on Tumor Cells. *Nanoscale*, 2010, vol. 2, no. 6, pp. 942–952. doi:10.1039/c0nr00080a.
7. Asha Rani, P. V., Low Kah Mun G., Hande M. P. Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 2009, vol. 3, pp. 279–290.
8. Stensberg M. C., Wei Q., McLamore E. S., Porterfield D. M., Wei A., Sepulveda M. S. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine (Lond)*, 2011, vol. 6, no. 5, pp. 879–898. doi:10.2217/nmm.11.78.
9. Solomon S. D., Bahadory M., Jeyarajasingam A. V., Rutkowsky S. A. Boritz C., Mulfinger L. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *J. Chem. Ed.*, 2007, vol. 84, no. 2, pp. 322–325.
10. Vithiya K., Sen S. Biosynthesis of nanoparticles. *IJPSR*, 2011, vol. 2, no. 11, pp. 2781–2785.
11. Wiwanitkit V., Sereemasapun A., Rojanathanes R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. *Fertil Steril*, 2009, vol. 91, pp. 7–8.
12. Taylor U., Petersen S., Barchanski A., Mittag A., Barcikowski S., Rath D. Influence of gold nanoparticles on vitality parameters of bovine spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 2010, vol. 45, pp. 60–60.
13. Braydich-Stolle L. K., Lucas B., Schrand A., Murdock R. C., Lee T., Schlager J., Hussain S., Hofmann M. C. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fynkinase signalling in spermatogonial stem cells. *Toxicol Sci*, 2010, vol. 116, pp. 577–589.
14. Carlson C., Hussain S. M., Schrand A. M. Unique cellular inter action of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B*, 2008, vol. 112, pp. 13608–13619.
15. Ahamed M., Karns M., Goodson M., Rowe J., Hussain S. M. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2008, vol. 233, pp. 404–410.
16. Wu Y., Zhou Q., Li H., Liu W., Wang T., Jiang G. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. *Aquat Toxicol*, 2010, vol. 100, pp. 160–167.
17. Grodzik M., Sawosz E. The influence of silver nanoparticles on chicken embryo development and bursa of Fabricius morphology. *J Anim Feed Sci*, 2006, vol. 15, pp. 111–114.
18. Rosas-Hernandez H., Jimenez-Badillo S., Martínez-Cuevas P. P. Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated aortic rings. *Toxicol. Lett.*, 2009, vol. 191, pp. 305–313.
19. Asharani P. V., Wu Y. L., Gong Z., Valiyaveetil S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 2008, vol. 19, 255102. doi:10.1088/0957-4484/19/25/255102.