

УДК 615.9: 620.22 — 022.532 : 546.57 : 578.084

# Получение наночастиц серебра с использованием полифенолов и оценка их влияния на клетки перитонеальной полости мышей C57BL/6 *in vivo*

Филиппов А.Г.<sup>1</sup>, Каплун А.П.<sup>2</sup>, Кубатиев А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, Балтийская, 8, Москва, 125315

<sup>2</sup> — Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Пр-т Вернадского, 86, Москва, 119571  
E-mail: algf@yandex.ru, e.a.martinova@gmail.com

Препараты наночастиц серебра (Ag-НЧ) получены с использованием танинов, а также экстракта коры дуба (*Quercus cortex*) в качестве восстановителей и стабилизаторов, и фосфатидилхолина в качестве со-стабилизатора. Для оценки формы и размера Ag-НЧ применяли просвечивающую электронную микроскопию и дифракцию электронов. Электронные спектры дисперсий Ag-НЧ получены на спектрофотометре. Биологические эффекты Ag-НЧ изучались *in vivo* на мышах самцах C57BL/6, которым Ag-НЧ [10–500 мкМ] вводились внутривентриально; через 3 часа перитонеальные клетки были выделены и проанализированы на проточном цитометре. Показано дозозависимое влияние данных Ag-НЧ на клетки иммунной системы, наиболее чувствительными оказались нейтрофилы перитонеальной полости мышей, при этом макрофаги и лимфоциты реагировали менее выражено. В концентрации до 10 мкМ полученные Ag-НЧ оказывали иммуномодулирующее влияние, но не обладали токсическим действием, что позволяет использовать их в дальнейшей работе с биологическими объектами.

**Список сокращений:** Ag-НЧ — наночастицы серебра; PBS — фосфатный буфер; H<sub>2</sub>Odest — дистиллированная вода; PI — пропидий йодид; ГЦК-решетка — гранецентрированная решетка

**Ключевые слова:** наночастицы серебра, токсичность, нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги, танины, полифенолы, наномедицина

## Введение

Развитие наноинженерии требует создания наностержней, наночастиц металлов, в том числе серебра, для последующего конструирования нанообъектов, с использованием их в наномедицине и других сферах нанотехнологии. В настоящее время рассматриваются возможности применения наночастиц серебра (Ag-НЧ) в медицине, например, для придания бактерицидной активности медицинским катетерам [17] и тканым материалам [4, 13]. Бактерицидные свойства Ag-НЧ позволяют им находить применения также в быту [18]. Растущая сфера использования Ag-НЧ требует подробного изучения биологического действия нанообъектов.

В настоящее время изучены некоторые биологические свойства Ag-НЧ, в частности, показаны их прооксидантные и генотоксические эффекты *in vitro* [1]. Показано токсическое действие Ag-НЧ на культуру альвеолярных макрофагов, вызванное угнетением митохондриальной функции, повышением уровня активных форм кислорода, истощением пула восстановленного глутатиона [2]. Антимикробный эффект Ag-НЧ объясняли генерацией активных форм кислорода на их поверхности [3, 11]. Большинство эффектов Ag-НЧ связывают с индуцированием окислительного стресса [14].

Существует много химических способов получения Ag-НЧ, основанных на восстановлении серебра из растворов его солей различными восстановителями в присутствии стабилизаторов, однако, не все методы технологичны, некоторые требуют использования токсичных реагентов,

например, органических растворителей, гидразина в качестве восстановителя, синтетических поверхностно-активных веществ в качестве стабилизаторов наночастиц. Поэтому особый интерес представляют методы синтеза Ag-НЧ с использованием в качестве восстановителей природных фенольных соединений, так как они не токсичны и одновременно являются стабилизаторами [8, 10, 21].

*Целью работы* было изучение *in vivo* в экспериментах на мышах биологического эффекта Ag-НЧ, полученных с помощью метода, основанного на использовании полифенолов.

## Материалы и методы

Раствор Ag-НЧ получали по следующей методике. Танин (Panreac) растворяли в H<sub>2</sub>Odest до концентрации 1 мг/мл. Готовили 1 М раствор нитрата диаминосеребра (I), прибавляя 30% водный раствор аммиака к раствору нитрата серебра (х.ч., ОАО Аурат), далее разбавляли до концентрации 1,5 мМ и вносили раствор танина до конечной концентрации 40 мкг/мл. Раствор мгновенно приобретал темно-коричневую окраску вследствие образования Ag-НЧ.

Оболочка продуктов окисления фенольных соединений, имеющаяся на поверхности Ag-НЧ и препятствующая их агрегации, не даёт стабилизирующего эффекта в солевой среде, что ограничивает их возможное биологическое применение. Поэтому наночастицы дополнительно стабилизировали соевым фосфатидилхолином, что позво-

лило получить Ag-НЧ, устойчивые в растворах физиологической концентрации хлорида натрия. В раствор Ag-НЧ вносили спиртовой раствор соевого фосфатидилхолина до его конечной концентрации 0,4 мМ и этанола 6%.

Для изучения биологического действия Ag-НЧ необходимо, чтобы в водном растворе наночастиц не было продуктов окисления восстановителя и невосстановленных ионов металла. Для этого Ag-НЧ отделяли от маточного раствора ультрацентрифугированием. В результате дисперсия Ag-НЧ содержала только незначительные количества продуктов окисления восстановителя и фосфолипидов только на поверхности наночастиц. Полученный раствор Ag-НЧ разбавляли физиологическим раствором в 5 раз и центрифугировали (ультрацентрифуга Optima™ L-90K Beckman Coulter, Inc.) в течение 25 мин при 45 000 g, супернатант сливали, осадок ресуспендировали в воде и центрифугировали повторно при 15 000 g 15 мин, супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в физиологическом растворе.

Во втором варианте получали фенольный экстракт коры дуба *Quercus cortex* (КрасногорскЛекСредства, ОАО), внося 1 г сырья в 10 мл 96% этанола. Через сутки отфильтровывали экстракт; в раствор нитрата диамминсеребра (I) концентрации 1,5 мМ вносили спиртовой экстракт коры дуба (100 мкл экстракта на 3 мл раствора), наночастицы стабилизировали фосфолипидом и отделяли ультрацентрифугированием (см. выше).

Для оценки формы и размера наночастиц, а также подтверждения образования фазы металлического серебра использовали просвечивающую электронную микроскопию и дифракцию электронов. Для получения электронных микрофотографий на медную сеточку, покрытую углеродной пленкой, наносили каплю раствора наночастиц и сушили на воздухе при комнатной температуре. Исследование выполнялось на приборе LEO 912 AB OMEGA (Cal Zeiss SMT AG, Oberkochen, Germany). (Мы благодарим доцента МГУ им. М.В. Ломоносова С.С. Абрамчука за съемку электронных микрофотографий).

Электронно-микроскопическое исследование растворов Ag-НЧ, полученных при использовании в качестве восстановителя танина, показало образование наночастиц сферической формы со средним диаметром  $14 \pm 4$  нм (рис. 1А). Хорошим восстановителем оказался спиртовой экстракт коры дуба (*Quercus cortex*), основным компонентом которого является эллаготанин [9]. Средний размер наночастиц серебра составил  $12 \pm 4$  нм (рис. 1Б). Электронно-дифракционная картина Ag-НЧ во всех случаях отвечала гранецентрированной кубической (ГЦК) решетке, подтверждая образование фазы металлического серебра.

Для получения электронных спектров (200–600 нм) дисперсий Ag-НЧ использовали спектрофотометр Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, USA). Концентрацию наночастиц серебра в дисперсиях определяли с использованием коэффициента молярного поглощения при длине волны 410 нм  $1 \times 10^4$  л/(моль·см).

Для изучения биологического действия раствора Ag-НЧ использовали 60 самцов мышей линии С57Bl/6, которым внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл физиологического раствора с Ag-НЧ заданной концентрации [0,1; 10; 100 и 500 мкМ]. Время воздействия (3 часа) Ag-НЧ определялось ранее проведенными экспериментами, в которых были отработаны временные параметры оптимальной ре-

гистрации биологической эффективности препаратов и обнаружения различия в популяциях и субпопуляциях клеток перитонеального экссудата. Через 3 ч мышей декапировали, что позволяло максимально обескровить мышцу и избежать попадания эритроцитов в перитонеальный экссудат, оголяли брюшную стенку, вводили стерильный физиологический раствор и в течение одной минуты промывали брюшную полость, отсасывали шприцом перитонеальный экссудат и сразу переносили его в 4%-ный параформальдегид на фосфатном буфере (PBS). Полученный раствор центрифугировали при 200 g в течение 10 мин, супернатант сливали, осадок встряхивали и к нему добавляли 4% параформальдегид на PBS, что позволяло хранить клетки при +4°C в холодильнике до исследования их на проточном цитофлуориметре.

Полученный препарат анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSCalibur, (Becton Dickinson Ltd, USA). За 15 мин перед исследованием суспензию окрашивали пропидиумом йодидом (PI) (1 мкг на  $10^6$  клеток) в гипотоническом буфере (0,1% цитрат натрия, 0,01% тритон X-100 на H<sub>2</sub>Odest). Такая методика позволяет PI проникать во все клетки, как в мертвые, так и живые, интеркалируя в двойную спираль ДНК и, таким образом, окрашивать диплоидные, апоптотные и делящиеся клетки.

Клетки перитонеальной полости также были фенотипированы на экспрессию специфических маркеров, идентифицирующих основные популяции клеток, то есть нейтрофилы (Ly6G<sup>+</sup>), лимфоциты (CD3<sup>+</sup> Т-лимфоциты и CD19<sup>+</sup> В-лимфоциты) и макрофаги (F4/80<sup>+</sup>) (все антитела фирмы BD Biosciences). Окраска клеток проводилась по стандартной методике фирмы.

## Результаты и обсуждение

Для выявления биологических эффектов Ag-НЧ клеток перитонеального экссудата мышей изучали методом проточной цитофлуориметрии. На полученной картине распределения клеток перитонеального экссудата в системе координат FSC/SSC (прямое и боковое светорассеяние) (рис. 2А) можно идентифицировать основные популяции клеток — лимфоциты, нейтрофилы, макрофаги, а также апоптотные клетки, которые обозначены гейтами R1, R2, R3 и R4 соответственно.

Биологический эффект был обнаружен уже при самой малой концентрации Ag-НЧ [0,1 мкМ], что выражалось в миграции нейтрофилов в перитонеальную полость

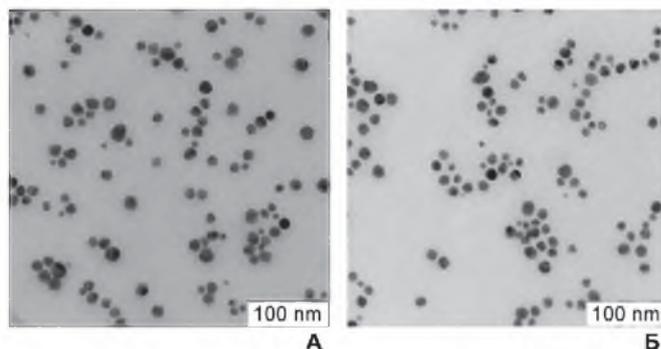


Рис. 1. Электронные микрофотографии дисперсий Ag-НЧ, полученных при использовании в качестве восстановителя танина (А) и экстракта *Quercus cortex* (Б).

**Относительное содержание (% от общего числа клеток) различных популяций клеток перитонеального экссудата при действии Ag-НЧ, полученных с использованием в качестве восстановителя экстракта *Quercus cortex*, и в контроле**

Ag-НЧ, Концентрация, мкМ	Лимфоциты Гейт R1	Нейтрофилы Гейт R2	Погибшие нейтрофилы Гейт R5	Макрофаги Гейт R3
Контроль	75 ± 4	15 ± 1	0	2 ± 0,1
500	67 ± 3*	0+0,1**	14 ± 2**	1 ± 0,1*
100	71 ± 4	10 ± 0,5*	8 ± 0,5**	2 ± 0,1
10	69 ± 3	11 ± 0,5*	0+0,1**	3 ± 0,2*
0,1	70 ± 4	20 ± 1*	0	2 ± 0,1

Примечание. \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,001$  по отношению к контролю

**Относительное содержание (% от общего числа клеток) различных популяций клеток перитонеального экссудата при действии Ag-НЧ, полученных с использованием танина, и в контроле**

Ag-НЧ, Концентрация, мкМ	Лимфоциты Гейт R1	Нейтрофилы Гейт R2	Погибшие нейтрофилы Гейт R5	Макрофаги Гейт R3
Контроль	59 ± 4	11 ± 1	0,5 ± 0,1	7 ± 0,4
500	48 ± 3*	12 ± 1	1,5 ± 0,1*	5 ± 0,3*
100	50 ± 4*	4 ± 0,2*	21 ± 1**	5 ± 0,3*
10	62 ± 3	9 ± 0,5*	3 ± 0,2*	8,5 ± 0,4*

Примечание. \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,001$  по отношению к контролю

(табл. 1 и рис. 2Б) и в увеличении их относительного содержания с 15% до 20%. Изменение относительного процентного содержания клеток более, чем на 5%, в нашем опыте является статистически достоверным ( $p < 0,05$ ), что позволяет говорить о выраженной тенденции влияния наночастиц серебра на клетки перитонеального экссудата.

Гейт нейтрофилов становится неоднородным под влиянием Ag-НЧ, что свидетельствует о наличии нескольких субпопуляций этих клеток (активированных, фагоцитирующих и т.д.). Одновременно в перитонеальной полости снижался относительный процент лимфоцитов (75% vs 70% в контроле).

По мере увеличения дозы Ag-НЧ наблюдается опустошение гейта нейтрофилов (гейт R2) (рис. 3 А2, Б2, В2), при этом происходит рост численности клеток в гейте, расположенном на диаграмме FSC/SSC левее гейта нейтрофилов (гейт R5) (рис. 3 А2, Б2, В2) и идентифицируемом как гейт погибших нейтрофилов.

Подобная тенденция увеличения токсического действия с ростом концентрации Ag-НЧ наблюдается и в возрастающем проценте апоптоза (рис. 4). Ag-НЧ в концентрации 10 мкМ обуславливают приток макрофагов и рост их относительного процентного содержания в 1,5 раза по сравнению с контролем. Приток макрофагов — позитивный момент с точки зрения использования Ag-НЧ в составе бактерицидных раневых повязок. Высокая концентрация Ag-НЧ [500 мкМ] приводила к истощению гейта макрофагов. Снижение жизнеспособности макрофагов при действии Ag-НЧ в высоких концентрациях также отмечалось ранее в ряде работ [2, 22].

В серии экспериментов с Ag-НЧ, полученными с использованием танина в качестве восстановителя, было показано (рис. 5), что воздействие Ag-НЧ в концентрации 10 мкМ ведет к появлению гейта погибших нейтрофилов (3% от общего числа клеток), а воздействие Ag-НЧ в большей концентрации 100 мкМ приводит к прогрессирующей

гибели нейтрофилов (21% от общего числа клеток) и, как следствие, к истощению гейта нейтрофилов (4% от общего числа клеток по сравнению с 11% в контроле), а также к уменьшению относительного процента лимфоцитов (50% по сравнению с 59% в контроле) (табл. 2).

Ag-НЧ в самой высокой концентрации 500 мкМ не оказывали токсического действия, наблюдалась только неоднородность гейтов макрофагов и нейтрофилов по сравнению с контролем (табл. 2).

Объяснить исчезновение токсичности можно, если предположить агрегацию наночастиц серебра в перитонеальной полости при введении их в организм животного в высокой концентрации, вероятно, под действием белков или ферментов. Токсичность Ag-НЧ зависит от размера частиц, поэтому крупные агрегаты могут не проявлять заметного токсического действия [2, 15, 19, 20, 22].

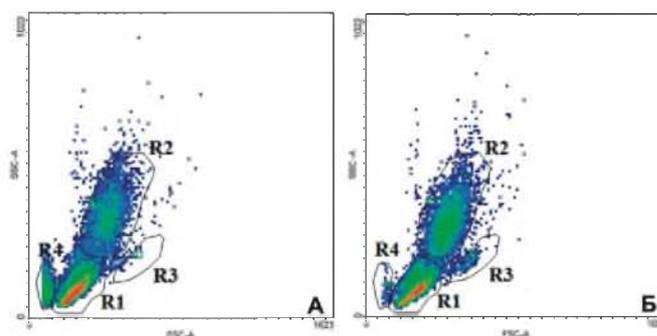


Рис. 2. Типичная картина распределения клеток перитонеального экссудата в координатах FSC/SSC на проточном цитометре.

А — контроль; Б — воздействие раствора Ag-НЧ, полученных с использованием в качестве восстановителя экстракта *Quercus cortex*, в концентрации 0,1 мкМ.

Гейт R1 соответствует лимфоцитам, R2 — нейтрофилам, R3 — макрофагам, R4 — апоптозным клеткам и детрису. Видимые изменения в наибольшей степени касаются нейтрофилов и, в меньшей степени, макрофагов.

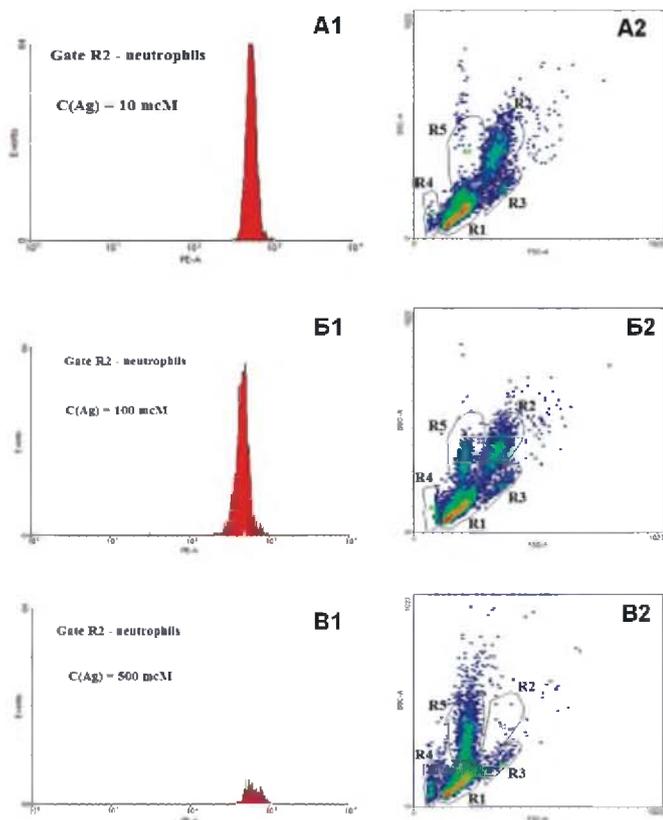


Рис. 3. Влияние различных концентраций Ag-НЧ, полученных с использованием в качестве восстановителя экстракта *Quercus cortex*, на клетки перитонеального экссудата. А1, Б1, В1 – гистограммы нейтрофилов (% и интенсивность флуоресценции на канале FL2-А). А2, Б2, В2 – картина распределения клеток перитонеального экссудата в координатах FSC/SSC. Воздействие раствора Ag-НЧ в концентрации: А – 10 мкМ, Б – 100 мкМ, В – 500 мкМ. Гейт R1 соответствует лимфоцитам, R2 – нейтрофилам, R3 – макрофагам, R4 – апоптозным клеткам и дебрису, R5 – погибшим нейтрофилам.

### Обсуждение результатов

Рассматривая причины возможного токсического действия Ag-НЧ, можно предполагать индуцирование окислительного стресса через электрокаталитическую генерацию активных форм кислорода на поверхности наночастиц [14] или повреждение наночастицами мембран митохондрий [1]. Косвенным подтверждением последнего является преимущественно токсическое действие на нейтрофилы, которые являются наиболее чувствительными клетками к окислительному стрессу [12] и содержат максимальное число митохондрий по сравнению с другими клетками иммунной системы.

Сравнение результатов экспериментов, проведенных с использованием Ag-НЧ, полученных с использованием танина и экстракта *Quercus cortex*, показывает их похожее воздействие на клетки, но имеются и отличия, вероятно обусловленные воздействием продуктов окисления восстановителя – аминфенолов, хинонов [16], которые все же остаются в малых количествах адсорбированными на наночастицах, что говорит о значении выбора конкретного полифенола при получении наночастиц серебра для биомедицинских применений.

Контрольный эксперимент с введением соевого фосфатидилхолина в концентрации 50 мкМ, сопоставимой

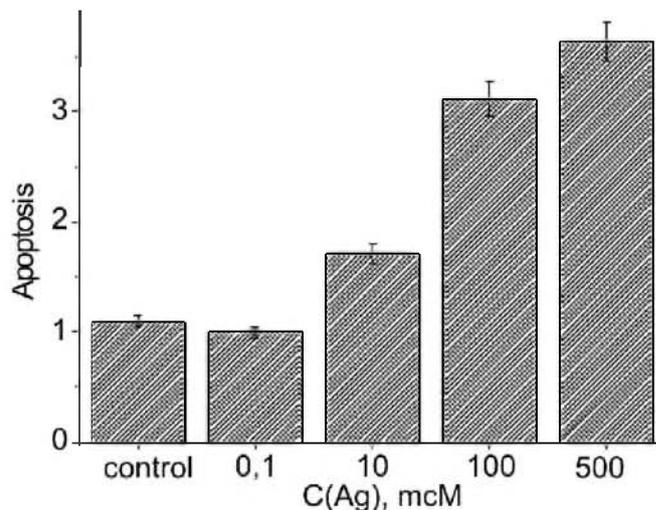


Рис. 4. Диаграмма зависимости процента апоптоза нейтрофилов перитонеального экссудата от концентрации наносеребра, полученного с использованием в качестве восстановителя экстракта *Quercus cortex*.

с оценочной концентрацией липида, находящегося на поверхности наночастиц, не показал отличие от контрольного эксперимента. Однако все же надо учитывать способность фосфатидилхолина стабилизирующей оболочки к довольно легкому окислению кислородом воздуха в процессе хранения наночастиц серебра с образованием окисленных липидов, которые обладают широким спектром биологической активности, включая цитостатическое и иммуномодулирующее действие [5–7].

Таким образом, с использованием нетоксичных фенольных соединений были получены Ag-НЧ, пригодные для дальнейших биомедицинских исследований. В модели *in vivo* на мышах показано дозозависимое действие Ag-НЧ на клетки иммунной системы; при этом обнаружено токсическое действие Ag-НЧ на нейтрофилы, начиная от концентрации 100 мкМ до 500 мкМ; показано отсутствие токсического действия в дозах 0,1 мкМ и 10 мкМ. Малые концентрации Ag-НЧ до 10 мкМ, не оказывающие токсического действия, потенциально могут рассматриваться для дальнейшего использования растворов Ag-НЧ в биологических объектах.

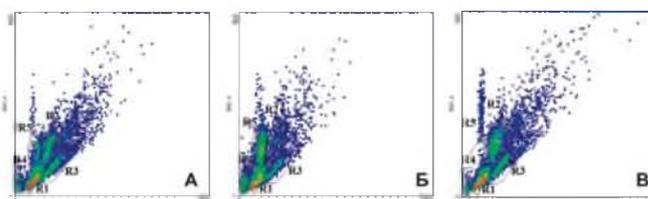


Рис. 5. Влияние различных концентраций Ag-НЧ, полученных с использованием в качестве восстановителя танина, на клетки перитонеального экссудата:

А, Б, В – картина распределения клеток перитонеального экссудата в координатах FSC/SSC. Воздействие дисперсии Ag-НЧ в концентрации: А – 10 мкМ; Б – 100 мкМ; В – контроль. Гейт R1 соответствует лимфоцитам, R2 – нейтрофилам, R3 – макрофагам, R4 – апоптозным клеткам и дебрису, R5 – погибшим нейтрофилам.

## Список литературы

1. Asharani P.V., Mun G.L., Kah, Hande M.P., Valiyavecttil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells // ACS Nano. — 2009. — Vol. 3, №2. — P. 279–290.
2. Carlson C., Hussain S.M., Schrand A.M., Braydich-Stolle L.K. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species // J. Phys. Chem. B. — 2008. — Vol. 112. — P. 13608–13619.
3. Chang Q., Yan L., Chen M., He H., Qu J. Bactericidal Mechanism of Ag/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> against Escherichia coli // Langmuir — 2007. — №23. — P. 11197–11199.
4. Chen C.-Y., Chiang C.-L. Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles // Mater. Lett. — 2008. — Vol. 62. — P. 3607–3609.
5. Chen R., Yang L., McIntyre T.M. Cytotoxic phospholipid oxidation products. Cell death from mitochondrial damage and the intrinsic caspase cascade // J. Biol. Chem. — 2007. — Vol. 282. — P. 24842–24850.
6. Chen R., Feldstein A.E., McIntyre T.M. Suppression of mitochondrial function by oxidatively truncated phospholipids is reversible, aided by bid, and suppressed by Bcl-XL // J. Biol. Chem. — 2009. — Vol. 284. — P. 26297–26308.
7. Gao S., Zhang R., Greenberg R.S., Sun M., Chen X. et al. Phospholipid hydroxyalkenals, a subset of recently discovered endogenous CD36 ligands, spontaneously generate novel furan-containing phospholipids lacking CD36 binding activity in vivo // J. Biol. Chem. — 2006. — Vol. 281. — P. 31298–31308.
8. Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants // Green Chem. — 2011. — Vol. 13. — P. 2638–2650.
9. König M., Scholz E., Hartmann R. et al. Ellagitannins and Complex Tannins from Quercus petraea Bark // Journal of Natural Products. — 1994. — Vol. 57, №10. — P. 1411–1415.
10. Kumar V., Yadav S.K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications // J. Chem. Technol. Biotechnol. — 2009. — Vol. 84. — P. 151–157.
11. Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.-H. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles // Nanomedicine: Nanotechnol., Biol., Med. — 2007. — Vol. 3. — P. 95–101.
12. Maianski N.A., Maianski A.N., Kuijpers T.W., Roos D. Apoptosis of neutrophils // Acta Haematologica. — 2004. — Vol. 111, №1–2. — P. 56–66.
13. Matyjas-Zgondek E., Bacciarelli A., Rybicki E., Szykowska M. et al. Antibacterial properties of silver-finished Textiles // Fibres and textiles in Eastern Europe. — 2008. — Vol. 16, №5. — P. 101–107.
14. Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel // Science — 2006. — Vol. 311. — P. 622–627.
15. Park J., Lim D.H., Lim H.J., Kwon T. Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticle // Chem. Comm. — 2011. — Vol. 47. — P. 4382–4384.
16. Pierpoint W. S.o-Quinones formed in plant extracts. Their reaction with amino acids and peptides // Biochem. J. — 1969. — Vol. 112. — P. 609–616.
17. Roe1 D., Karandikar1 B., Bonn-Savage N., Gibbins B. et al. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. — 2008. — Vol. 61. — P. 869–876.
18. Silver S., Phung Le T., Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds // J. Ind. Microb. Biotechnol. — 2006. — Vol. 33. — P. 627–634.
19. Shavandi Z., Ghazanfari T., Moghaddam K.N. In vitro toxicity of silver nanoparticles on murine peritoneal macrophages // Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2011. — Vol. 33. — P. 135–140.
20. Skebo J.E., Grabinski C.M., Schrand A.M., Schlager J.J. et al. Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system // Int. J. Toxicol. — 2007. — Vol. 26. — P. 135–141.
21. Song J.Y., Kim B.S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts // Bioproc. Biosyst. Eng. — 2009. — Vol. 32. — P. 79–84.
22. Yen H., Hsu S., Tsai C. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes // Small. — 2009. — Vol. 13. — P. 1553–1561.

Поступила 3.04.2013

## Silver nanoparticle synthesis and an estimation of these effects in vivo on the peritoneal cells from the male mouse C57BL/6

Filippov A.G.<sup>1</sup>, Kaplun A.P.<sup>2</sup>, Kubatiev A.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315

<sup>2</sup> — Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, 86, Vernadskogo prospect, Moscow, 119571  
E-mail: algf@yandex.ru, e.a.martinova@gmail.com

*The silver nanoparticles (Ag-NPs) have been prepared using the tannins or Quercus cortex as the reducing and stabilizing agents as well as the phosphatidyl choline as a co-stabilizer. The Ag-NPs forms and sizes were evaluated using a transmission electron microscopy. Ag-NPs disperses electron specters were analyzed by spectrophotometer. In vivo biological effects of these Ag-NPs were estimated using the male mouse C57Bl/6. The Ag-NPs [10 – 500 microM] have been injected intraperitoneally for 3 hours followed by a quantitative analysis of the peritoneal cells using the flow cytometer. The dose-dependent effects of these Ag-NPs have been registered. The peritoneal neutrophils have been found to be the most sensitive cells compared with macrophages and lymphocytes. The Ag-NPs in the concentration < 10 microM possess the immune modulatory effects and were not been toxic that allows us to use these Ag-NPs in the future work with the biological systems.*

**Key words:** silver nanoparticles, toxicity, neutrophils, lymphocytes, macrophages, tannins, polyphenols, nanomedicine