

В. Е. КАЛИНОВСКИЙ¹, А. С. ПУСТОВАЛОВ¹, Г. Я. ГРОДЗЮК²,
Н. С. АНДРЮШИНА², Н. Э. ДЗЕРЖИНСКИЙ¹

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМНОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ И РАСТВОРОВ СОЛЕЙ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА НА РАЗМЕРЫ ЯДЕР НЕЙРОНОВ ГИПОТАЛАМУСА САМЦОВ КРЫС

Поступила 17.06.15

Исследовали влияния курсовых (10 дней) внутрибрюшинных введений растворов солей золота и серебра и коллоидных растворов наноразмерных частиц этих металлов на величину (средние значения поперечных сечений) ядер нейроцитов гипоталамических структур (преоптического и аркуатного ядер) неполовозрелых самцов белых крыс. У животных, которым вводили тетрахлораурат натрия, исследуемый морфометрический параметр в обоих гипоталамических ядрах достоверно превышал контрольные значения. Введение же наночастиц золота обуславливало достоверное уменьшение сечения ядер нейроцитов; таким образом, характер действия золота зависел от его физико-химической формы. Введение и раствора соли серебра (AgNO_3), и его наночастиц вызывало уменьшение средних значений сечения ядер нейроцитов. Таким образом, изменения исследуемой морфофункциональной характеристики клеток гипоталамических ядер под влиянием системных инъекций коллоидных растворов наночастиц золота и серебра свидетельствуют о подавлении функций центрального звена гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы при воздействии этих факторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: золото, серебро, ионы, наночастицы, аркуатное ядро, преоптическое ядро, гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось.

ВВЕДЕНИЕ

В современной науке все большее внимание уделяется изучению и поиску путей практического применения наноразмерных структур. Как наноразмерные квалифицируются объекты, линейные размеры которых хотя бы в одном измерении не превышают 100 нм [1]. При подобных размерных характеристиках частицы различных веществ приобретают новые физико-химические свойства, и такие агенты могут найти применение в разных областях науки и практики, в частности в медицине [2, 3]. Уже сейчас открыты перспективы разнообразного практического применения наночастиц углерода [4], цезия [5], золота (НЧЗ) [6], серебра (НЧС) [7].

НЧЗ начали использоваться в медицине для фототерапии онкологических заболеваний, доставки лекарственных средств и создания биосенсоров [3, 8–11]. Серебро же, ионы которого обладают хорошо известными антибактериальными свойствами, применяется в виде НЧС для обеззараживания воды, пищевых продуктов, создания перевязочных материалов и антисептиков [12–16]. Несмотря на то что практическое применение наночастиц обоих упомянутых элементов уже приобрело весьма широкий характер, вопрос о безопасности подобного использования (в частности, такой аспект, как наличие/отсутствие токсических свойств у соответствующих агентов) пока изучен явно недостаточно. Большая часть работ, направленных на выяснение токсичности наночастиц, выполнялись и продолжают выполняться *in vitro*; исследования же *in vivo* направлены в основном на изучение фармакокинетики данных средств [3]. В ряде работ была продемонстрирована возможность накопления наночастиц в мозгу и органах репродуктивной системы (семенниках) [17, 18], однако

¹ УНЦ «Институт биологии», Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Киев (Украина).

² ООО «Наномедтех», Киев (Украина).

Эл. почта: squilchuw@gmail.com (В. Е. Калиновский);
aspustovalov@yandex.ua (А. С. Пустовалов);
nanosvin@meta.ua (Г. Я. Гродзюк);
natashaand9@gmail.com (Н. С. Андриюшина);
cytology@univ.kiev.ua (Н. Э. Дзержинский).

проблема влияния наноразмерных форм металлов на функционирование упомянутой системы изучена крайне слабо.

У млекопитающих центральным регулятором активности такой важнейшей функциональной системы, как гипоталамо-гипофизарно-гонадная (ГГГС), являются нейроны преоптических и аркуатных ядер гипоталамуса (ПОЯ и АЯ соответственно). В преоптической области располагаются тела продуцирующих гонадолиберин нейронов, нейросекреторная активность которых обеспечивает регуляцию деятельности гонадотропоцитов аденогипофиза [19]. Необходимо отметить, что у данных нейронов отсутствуют рецепторы, чувствительные к половым стероидам; поэтому они не могут обеспечивать регуляцию функции ГГГС с участием негативной обратной связи. Такой контроль в значительной степени выполняется нейронами АЯ, которые можно рассматривать как главный центральный регуляторный компонент ГГГС [20]. Модуляция активности нейроцитов ПОЯ опосредуется пептидом кисспептином, секреция которого аркуатными нейронами приводит к интенсификации синтеза и секреции гонадолиберина [21]. Состояние системы «кисспептин–гонадолиберин» прямо коррелирует с уровнем функциональной активности ГГГС. Патологические изменения опосредованной кисспептином сигнализации наблюдаются при развитии многих заболеваний половой системы [22, 23].

С учетом изложенного выше мы исследовали изменения одного из морфофункциональных параметров нейронов ПОЯ и АЯ у крыс после системного введения растворимых солей, НЧЗ и НЧС. Предполагалось, что размерные характеристики ядер нейроцитов указанных гипоталамических структур коррелируют с функциональным состоянием этих клеток.

МЕТОДИКА

НЧЗ получали путём восстановления тетрахлораурата(III) натрия аскорбиновой кислотой в присутствии полифосфата натрия (ПФН) в качестве стабилизатора. Для этого в водный раствор NaAuCl_4 (1.0 мМ) при интенсивном перемешивании добавляли ПФН, NaOH и аскорбат натрия (конечные концентрации 0.25, 0.01 и 1.0 мМ соответственно). Для получения НЧС производили восстановление нитрата серебра в аналогичных условиях.

Физико-химические свойства полученных наносуспензий (коллоидных растворов) контролировали с использованием растровой электронной микроскопии (LMU Mira3 Tescan; «Tescan a.s.», Чехия) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (Oxford X-MAX 80 mm²; «Oxford Instruments», США). Полученные наночастицы имели размеры 8–12 нм. Готовые растворы хранили в темноте при комнатной температуре.

Эксперименты были проведены на 36 неполовозрелых самцах лабораторных белых крыс (возраст один месяц, масса тела 100–110 г). Животные были разделены на шесть групп по шесть животных в каждой. Животным первой контрольной группы вводили изотонический (0.9 %) раствор NaCl («АТЗТ Индар», Украина). Крысам второй контрольной группы (холостая проба) инъецировали раствор ПФН (0.25 мМ). Животным третьей и четвертой групп вводили раствор NaAuCl_4 и коллоидный раствор НЧЗ (1.0 мМ), а крысам пятой и шестой групп – растворы AgNO_3 и НЧС (в концентрациях 2.0 мМ) соответственно. Все препараты инъецировали внутривентриально в объемах 0.5мл/100г массы тела в 10.00 в течение 10 дней. В последний день эксперимента через час после инъекций животных усыпляли в атмосфере CO_2 , декапитировали, после чего извлекали головной мозг для дальнейшей обработки.

Для гистологических исследований образцы головного мозга фиксировали в смеси Буэна в течение 72 ч, после чего обезжировали и заливали в парафин по общепринятой методике [24]. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм с включением гипоталамических ядер. Отбранные срезы окрашивали гематоксилином Бёмера и эозином.

Препараты просматривали на микроскопе Zeiss Primo Star («Carl Zeiss Microscopy GmbH», ФРГ) при увеличении $\times 400$, и с помощью цифровой камеры Tucsen 5.0MP CMOS TCA-5.0C («Tucsen Photonics», КНР) изготавливали цветные микрофотографии клеточных элементов. В качестве оцениваемого критерия морфофункционального состояния нейроцитов использовали площадь поперечного сечения ядер этих клеток, которую измеряли с помощью программы «ImageJ» (National Institutes of Health, США). Размеры ядер исследуемых нейроцитов могут рассматриваться как коррелят интенсивности синтетических метаболических процессов в данных клетках.

Статистический анализ полученных результатов

проводили с помощью программы «Statistica 8.0». Характер распределений числовых значений оценивали с применением W-критерия Шапиро–Уилка. Поскольку отклонения распределений этих значений от нормальности были несущественными, межгрупповые сравнения выполняли с использованием *t*-критерия Стьюдента. Числовые данные представлены ниже как среднее \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Достоверными считали различия между наблюдаемыми показателями при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как инъекции физиологического раствора и раствора ПФН, так и введение растворов солей золота и серебра и коллоидных растворов НЧЗ и НЧС не вызывали развития каких-либо грубых (легко определяемых визуально) изменений морфологии нейроцитов АЯ и ПОЯ.

Введение раствора ПФН подопытным животным второй группы не вызывало каких-либо достоверных изменений средних значений поперечных сечений ядер упомянутых гипоталамических структур от аналогичных значений в первой группе (интактный контроль; см. таблицу). В соответствии с этим можно утверждать, что все эффекты, вызванные введением НЧЗ, НЧС и растворов солей золота и серебра, обусловлены действием именно указанных агентов.

Введение раствора NaAuCl_4 обуславливало достоверное превышение средней площади сечения ядер нейронов АЯ и ПОЯ по сравнению с контрольными величинами; соответствующие инкременты составляли 5.0 и 6.6 % соответственно. Таким образом, системно введенные ионы золота (вернее,

ионы тетрахлораурата), очевидно, оказывают заметное стимулирующее влияние на ГГГС. Сведения о механизмах действия золота на половую систему и ее центральное регуляторное звено – гипоталамические ядра – пока крайне ограничены. Было показано [25], что введение растворов солей золота неполовозрелым крысам ускоряет становление процесса сперматогенеза. Авторы связывали этот эффект с повышением активности гидроксистероиддегидрогеназ в семенниках, хотя в целом механизм такого действия остается неизвестным [25].

После введений подопытным животным НЧЗ наблюдался противоположный эффект – системные инъекции коллоидного золота вызывали достоверное (более чем на 3 %) уменьшение средних значений измеряемого морфометрического параметра в обоих гипоталамических ядрах (см. таблицу). Полагают, что биологические эффекты наночастиц металлов могут быть опосредованы или прямым действием попадающих в ткани наноразмерных структур как таковых, или влиянием ионов, которые могут отделяться от поверхности введенных наноструктур [26]. Если учесть разнонаправленность действия ионов золота (тетрахлораурата) и НЧЗ на размеры ядер нейроцитов ПОЯ и АЯ, можно полагать, что негативное влияние НЧЗ на активность ГГГС связано с действием непосредственно соответствующих наночастиц. Было обнаружено, что НЧЗ при длительном введении могут оказывать отрицательное влияние на структуру и функцию семенников, вызывая появление в этих органах морфологических аномалий [27, 28]. В других работах было показано, что действие подобных частиц может приводить к нарушениям функциональных взаимосвязей в пределах ГГГС. Известно, что НЧЗ могут проходить через разные биологические барьеры, в том числе гемато-энцефалический и гема-

Изменения поперечного сечения ядер нейроцитов гипоталамических структур

Зміни поперечного перерізу ядер нейроцитів гіпоталамічних структур

Группы животных, вводимый агент	Средняя площадь поперечного сечения ядер ($M \pm m$, $\mu\text{км}^2$)	
	аркуатное ядро	преоптическое ядро
Первая (контроль)	38.21 \pm 0.42	35.76 \pm 0.30
Вторая (холостая проба)	37.93 \pm 0.51	36.25 \pm 0.37
Третья (р-р NaAuCl_4)	40.11 \pm 0.41*	38.12 \pm 0.35*
Четвертая (НЧЗ)	36.81 \pm 0.33*+	34.55 \pm 0.27*+
Пятая (р-р AgNO_3)	34.90 \pm 0.44*	32.67 \pm 0.31*
Шестая (НЧС)	36.27 \pm 0.35*+	33.82 \pm 0.29*+

Примечание. Звездочками и крестиками отмечены, соответственно, случаи достоверных ($P < 0.05$) отличий среднего значения параметра в экспериментальных группах от контроля и различий между значениями в группе, животным которой вводили соль металла, и группе с введением соответствующих наночастиц.

то-тестикулярный. Было продемонстрировано, что при действии НЧЗ активность сперматогенеза сохраняется на постоянном уровне, несмотря на изменения концентрации тестостерона в плазме крови [29]. Учитывая, что в наших экспериментах было выявлено заметное уменьшение размеров ядер нейроцитов в обоих центрах регуляции половой системы (что можно рассматривать как коррелят умеренного подавления их функциональной активности), следует предполагать, что введение НЧЗ вызывает ингибирование регуляторной активности ГГГС.

После курсового внутрибрюшинного введения нитрата серебра оба измеряемых морфометрических параметра достоверно и достаточно значительно уменьшались по сравнению с контролем (на 8.7–8.8 %; см. таблицу). Этот факт указывает на то, что системное введение ионов Ag^+ , очевидно, подавляет активность центрального звена регуляции функций репродуктивной системы. Основным механизмом действия Ag^+ является неспецифическое блокирование сульфгидрильных групп разнообразных белков. Это обуславливает нарушения процессов внутриклеточной сигнализации, работы электронтранспортной сети митохондрий и окислительно-восстановительного баланса [30–32]. Таким образом, ионы серебра являются неспецифическим токсикантом, который может действовать как на периферические ткани, так и на центральные (в частности, гипоталамические) регуляторные структуры.

Действие НЧС на нейроны гипоталамуса носило в целом сходный характер: мы наблюдали достоверное уменьшение (примерно на 5 %) измеряемого нами морфометрического параметра (сечения ядер клеток ПОЯ и АЯ; см. таблицу). Магнитуа этих изменений была меньше, чем у животных, которым вводили нитрат серебра, но несколько больше, чем аналогичный сдвиг в группе НЧЗ. Негативные эффекты НЧС в отношении периферических компонентов ГГГС были описаны ранее, хотя какие-либо конкретные интерпретации механизмов такого действия не предлагались [6, 13, 17]. Известно, что биологические эффекты НЧС во многом обусловлены действием свободных ионов серебра, отделяющихся от поверхности таких частиц [32]. Вероятно, аналогичный процесс отделения ионизированного золота от поверхности НЧЗ является менее интенсивным, тогда как подобное высвобождение ионов Ag^+ в нашем эксперименте было более существенным; следует, однако, учитывать, что биологические эффекты ионов серебра, видимо, сами по себе более интенсивны, чем аналогичные эффекты зо-

лотосодержащих ионов. Поскольку характер изменений в гипоталамусе крыс при действии НЧС в целом соответствовал таковому при действии НЧЗ, можно полагать, что токсическое действие обеих этих наноструктур является неспецифическим.

Таким образом, мы обнаружили, что НЧЗ и НЧС, видимо оказывают в целом негативное влияние на функционирование центрального компонента ГГГС (гипоталамических ядер, вовлеченных в соответствующие регуляторные процессы). Эффекты системного введения НЧЗ и тетрахлораурат-ионов существенно различаются, тогда как эффекты введения НЧС и ионов Ag^+ сходны по направленности. Определение конкретных механизмов изменений, наблюдаемых при этом в центральных звеньях ГГГС, требует дальнейших исследований.

Эксперименты на животных были проведены в соответствии с положениями Хельсинкской Декларации 1975 г., пересмотренной и дополненной в 2000 г. В работе соблюдались современные правила содержания и использования лабораторных животных, соответствующие принципам Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1985).

У всех авторов – В. Е. Калиновского, А. С. Пустовалова, Г. Я. Гродзюк, Н. С. Андриюшиной и Н. Э. Держинского – отсутствует какой-либо конфликт интересов относительно коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованиями, а также взаимоотношений соавторов статьи.

В. Е. Калиновский¹, А. С. Пустовалов¹, Г. Я. Гродзюк², Н. С. Андриюшина², М. Е. Держинский¹

ВПЛИВ СИСТЕМНОГО ВВЕДЕННЯ НАНОЧАСТИНОК І РОЗЧИНІВ СОЛЕЙ ЗОЛОТА І СРІБЛА НА РОЗМІРИ ЯДЕР НЕЙРОНІВ ГІПОТАЛАМУСА САМЦІВ ЩУРІВ

¹ УНЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка (Україна).

² ТОВ «Наномедтех», Київ (Україна).

Резюме

Досліджували впливи курсових (10 днів) внутрішньоочеревинних уведень розчинів солей золота і срібла та колоїдних розчинів нанорозмірних частинок цих металів на величину (середні значення поперечних розрізів) ядер нейроцитів гіпоталамічних структур (преоптичного та аркуатного ядер) нестатевозрілих самців білих щурів. У тварин, котрим вводили тетрахлораурат натрію, досліджуваний морфометричний параметр в обох гіпоталамічних ядрах вірогідно

перевищував контрольні значення. Введення ж наночастинок золота зумовлювало вірогідне зменшення розрізу ядер нейроцитів; таким чином, характер дії золота залежав від його фізико-хімічної форми. Введення і розчину солі срібла (AgNO_3), і його наночастинок викликало зменшення середніх значень розрізу ядер нейроцитів. Таким чином, зміни досліджуваної морфофункціональної характеристики клітин гіпоталамічних ядер під впливом системних ін'єкцій колоїдних розчинів наночастинок золота і срібла свідчать про пригнічення функцій центральної ланки гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи при дії цих факторів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Т. М. Бойчук, Н. Й. Андрійчук, Л. І. Власик, "До проблеми оцінки токсичності наночастинок срібла", *Клін. та експерим. патологія*, **11**, № 4, 151-157 (2012).
2. L. Yildirim, N. T. K. Thanh, M. Loizidou, et al., "Toxicology and clinical potential of nanoparticles," *Nano Today*, **6**, No. 6, 585-607 (2011).
3. X. Lu, Y. Liu, X. Kong, et al., "Nanotoxicity: a growing need for study in the endocrine system," *Small*, **9**, Nos. 9/10, 1654-1671 (2013).
4. A. M. Monaco and M. Giugliano, "Carbon-based smart nanomaterials in biomedicine and neuroengineering," *Beilstein J. Nanotechnol.*, **5**, 1849-1863 (2014).
5. S. Das, J. M. Dowding, K. E. Klump, et al., "Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine," *Nanomedicine*, **8**, No. 9, 1483-1508 (2013).
6. C. A. Dos Santos, M. M. Seckler, A. P. Ingle, et al., "Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues," *J. Pharm. Sci.*, **103**, No. 7, 1931-1944 (2014).
7. E. C. Dreaden, A. M. Alkiany, X. Huang, et al., "The golden age: gold nanoparticles for biomedicine," *Chem. Soc. Rev.*, **41**, No. 7, 2740-2779 (2011).
8. M. Eghtedari, A. V. Liopo, J. A. Copland, et al., "Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells," *Nano Lett.*, **9**, No. 1, 287-291 (2009).
9. A. M. Pekkanen, M. R. DeWitt, and M. N. Rylander, "Nanoparticle enhanced optical imaging and phototherapy of cancer," *J. Biomed. Nanotechnol.*, **10**, No. 9, 1677-1712 (2014).
10. K. Bhattacharyya, B. S. Goldschmidt, M. Hannink, et al., "Gold nanoparticle-mediated detection of circulating cancer cells," *Clin. Lab. Med.*, **32**, No. 1, 89-101 (2012).
11. P. C. Ray, H. Yu, and P. P. Fu, "Nanogold-based sensing of environmental toxins: excitement and challenges," *J. Environ. Sci. Health. Ser. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, **29**, No. 1, 52-89 (2011).
12. M. Mishra and P. Chauhan, "Nanosilver and its medical implications," *J. Nanomed. Res.*, **2**, No. 5, 20-30 (2015).
13. J. H. Lee, Y. S. Kim, K. S. Song, et al., "Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats," *Part. Fibre Toxicol.*, **10**, No. 1, 36 (2013).
14. M. Yamada, M. Foote, and T. W. Prow, "Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **7**, No. 3, 428-445 (2015).
15. L. Rizzello and P. P. Pompa, "Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines," *Chem. Soc. Rev.*, **43**, No. 5, 1501-1518 (2014).
16. X. Liu, P. Y. Lee, C. M. Ho, et al., "Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing," *Chem. Med. Chem.*, **5**, No. 3, 468-475 (2010).
17. M. Thakur, H. Gupta, D. Singh, et al., "Histopathological and ultra structural effects of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration," *J. Nanobiotechnol.*, **12**, No. 1, 42 (2014).
18. S. T. Zakhidov, S. M. Pavlyuchenkova, T. L. Marshak, et al., "Effect of gold nanoparticles on mouse spermatogenesis," *Biol. Bul.*, **39**, No. 3, 229-236 (2012).
19. M. G. Matvienko, A. S. Pustovalov, N. A. Buzynskaya, et al., "Morphofunctional modifications of cells of the preoptic hypothalamic nucleus of prepubescent rats under conditions of stimulation and blocking of the α -adrenergic and kisspeptinergetic systems," *Neurophysiology*, **45**, Nos. 5/6, 417-422 (2013).
20. M. G. Matvienko, A. S. Pustovalov, and N. E. Dzerzhinsky, "Variety of functions and effects of kisspeptin," *Biopolym. Cell*, **29**, No. 1, 11-20 (2013).
21. H. M. Dungan, D. K. Clifton, and R. A. Steiner, "Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion," *Endocrinology*, **147**, No. 3, 1154-1158 (2006).
22. J. S. Fuqua, "Treatment and outcomes of precocious puberty: an update," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **98**, No. 6, 2198-2207 (2013).
23. V. M. Navarro and M. Tena-Sempere, "Neuroendocrine control by kisspeptins: Role in metabolic regulation of fertility," *Nat. Rev. Endocrinol.*, **8**, No. 1, 40-53 (2011).
24. П. Д. Лилли, *Патогистологическая техника и практическая гистохимия*, Мир, Москва (1969).
25. N. Biswas, A. Chattopadhyay, and M. Sarkar, "Effects of gold on testicular steroidogenic and gametogenic functions in immature male albino rats," *Life Sci.*, **76**, No. 6, 629-636 (2004).
26. E. Frohlich, "Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles," *Current Drug Metab.*, **14**, No. 9, 976-988 (2013).
27. W. H. De Jong, W. I. Hagens, P. Krystek, et al., "Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration," *Biomaterials*, **29**, No. 12, 1912-1919 (2008).
28. A. Pizent, B. Tariba, and T. Živković, "Reproductive toxicity of metals in men," *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, **63**, Suppl. 1, 35-46 (2012).
29. B. Huppertz, "Nanoparticles: Barrier thickness matters," *Nat. Nanotechnol.*, **6**, No. 12, 758-759 (2012).
30. O. Gordon, T. Vig Slenters, P. S. Brunetto, et al., "Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction," *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**, No. 10, 4208-4218 (2010).
31. J. Y. Kim, C. Lee, M. Cho, et al., "Enhanced inactivation of *E. coli* and MS-2 phage by silver ions combined with UV-A and visible light irradiation," *Water Res.*, **42**, Nos. 1/2, 356-362 (2009).
32. W. Likus, G. Bajor, and K. Siemianowicz, "Nanosilver – does it have only one face?" *Acta Biochim. Pol.*, **60**, No. 4, 495-501 (2013).