

М.Л. Тындык¹, И.Г. Попович¹, А.В. Малек¹, Р.Б. Самсонов¹, Н.А. Германов^{2,3},
С.Н. Голяндин^{2,3}, С. В. Мочалов², С. А. Пульнев^{2,3}, В.Н. Анисимов¹

Изучение противоопухолевого эффекта коллоидного бисиликата серебра в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

¹ФБГУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,
²ООО «Нанометалл»,

³ФГБУН Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, Санкт-Петербург

В работе представлены результаты изучения противоопухолевой активности нового препарата, представляющего собой атомные кластеры серебра (АКС) в виде коллоидного раствора наноструктурированного бисиликата серебра $Ag_6Si_2O_7$ с размером частиц 1–2 нм в деионизованной воде. В экспериментальных исследованиях *in vitro*, проведенных на культурах клеток опухолей человека (рака молочной железы, карциномы толстой кишки и рака предстательной железы), оценивали активность различных доз препарата АКС. Наибольшая противоопухолевая активность АКС наблюдалась при его использовании в концентрациях от 2,7 мг/л до 5,1 мг/л и выражалась в гибели опухолевых клеток во всех изученных клеточных культурах. В опытах *in vivo* на модели перевиваемой опухоли Эрлиха у мышей было показано, что введение АКС с питьевой водой в суточной дозе 0,75 мг/кг существенно тормозило рост опухолевого узла, начиная с 14 суток опыта (максимально на 52% на 28 сутки, $p < 0,05$) по сравнению с контролем. При подкожном введении животным препарата АКС в дозе 2,5 мг/кг торможение роста опухоли Эрлиха было отмечено на 7-е и 10-е сутки эксперимента ($p < 0,05$).

Ключевые слова: коллоидный бисиликат серебра, противоопухолевая активность, культуры клеток опухолей, перевиваемая опухоль Эрлиха

Введение

В ряде работ показано, что разнообразные наночастицы обладают уникальными свойствами, которые могут быть использованы для лечения рака [1]. Особый интерес представляют наночастицы серебра и его соединений, обладающие цитотоксическим потенциалом [2]. В частности, токсичность ионов серебра, высвобождаемых с поверхности наночастицы, проявляется генерацией активных форм кислорода (АФК), которые

вызывают повреждения опухолевых клеток. Характер этих повреждений может быть различным: это и разрывы ДНК, изменения функций митохондрий, нарушения клеточного цикла, апоптоз и т.д.

Актуальной задачей при создании наночастиц серебра или коллоидного серебра (КС) является получение соединений, имеющих определенные размеры, а также обладающих стабильностью как в растворах, так и при воздействии внешних факторов [3].

Для изучения противоопухолевых свойств новых препаратов или веществ часто используются культуры клеток опухолей человека. Изучение эффекта веществ *in vitro* позволяет сравнительно быстро получить данные как о противоопухолевом потенциале препарата, так и о некоторых механизмах действия этих веществ. В экспериментах *in vivo*, в частности, на моделях перевиваемых опухолей, оценивается степень противоопухолевого эффекта новых препаратов или веществ, выживаемость животных и их влияние на метастазирование.

Нами была изучена противоопухолевая активность нового препарата — коллоидного бисиликата серебра ($Ag_6Si_2O_7$) на рост опухолевых клеточных линий *in vitro* и на динамику роста перевиваемой опухоли Эрлиха у мышей.

Материалы и методы

В работе представлены результаты изучения противоопухолевой активности нового препарата — коллоидного раствора наноструктурированного бисиликата серебра $Ag_6Si_2O_7$ или атомных кластеров серебра (АКС) с размером частиц 1–2 нм в деионизованной воде [4].

В исследовании *in vitro* изучали жизнеспособность опухолевых клеточных линий при воздействии различных концентраций нового препарата коллоидного серебра. При этом были использованы клеточные линии рака молочной железы MDA-MB-231, карциномы толстой кишки HT29 и рака предстательной железы PC3. Клетки наращивали в 10 мл среды RPMI-1640 с добавлением 10% телячьей сыворотки при 37°C и содержании CO_2 8%. Рост контролировали с помощью инвертированного биологического

микроскопа МИБ-Р (ЛОМО). На 5-е сутки удаляли среду, культуру клеток промывали раствором PBS и в течение 3-5 минут обрабатывали 0,25% раствором трипсина для снятия клеток со дна флакона. Подсчет количества клеток проводили автоматическим счетчиком клеток TC20 (Bio-Rad). Клетки высевали на 96-и луночный планшет по 1500 клеток на лунку и оставляли на 4 часа в инкубаторе для роста и прикрепления к пластику. Далее к клеткам добавляли препарат АКС — это коллоидный бисиликат серебра $Ag_6Si_2O_7$, который способен к образованию водных коллоидных растворов с размером частиц 1-2 нм. В работе использовали АКС в следующих концентрациях: лунки 1-2 — 5,1 мг/л, 3-4 — 3,9 мг/л, 5-6 — 2,7 мг/л, 7-8 — 1,5 мг/л, 9-11 — исходная культура, 12 — среда без клеток (здесь и далее в мг/л указывается содержание бисиликата серебра в среде).

Для оценки жизнеспособности из лунок отбирали среду, содержащую АКС, и добавляли среду RPMI-1640, содержащую 1% (v/v) Cell counting kit-8 (Dojindo, Германия). Планшеты помещали на ночь в инкубатор для развития окраски, после чего проводили измерение оптической плотности при длине волны 450 нм на Chromate Microplate reader. Измерения проводили на 1, 4, 7 и 10 сутки после внесения АКС в культуру клеток.

Результаты опыта обрабатывали статистически по методу Стьюдента с помощью компьютерной программы STATGRAPH. Различия оценивались значимыми при $p < 0,01$.

В исследованиях *in vivo* изучали противоопухолевый эффект коллоидного бисиликата серебра $Ag_6Si_2O_7$ у мышей с перевиваемой солидной опухолью Эрлиха.

Опыты проведены на мышях самках аутбредной линии SHR (с массой тела $27,3 \pm 0,66$ гр.) собственной разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Животных содержали в стандартных клетках типа T2 в вентилируемом помещении вивария при стандартном режиме освещения и температуре 20-22 °C. Мыши получали стандартный лабораторный корм ПК120 фирмы «Лабораторкорм» (Москва) и питьевую воду. Все эксперименты с животными и выведение их из опыта были проведены в соответствии с нормами биоэтики [5]. Исследование по изучению противоопухолевой активности нового препарата АКС осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями [6].

В работе был использован штамм перевиваемой опухоли Эрлиха мышей, поддерживаемый в виварии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России в виде асцитной формы рака, представляющего суспензию опухолевых клеток, перевиваемых внутрибрюшинно.

Оценка опухолевого роста проводилась по стандартной методике. Измеряли длину и ширину опухолевых узлов. Объем опухоли рассчитывали по формуле:

$$V = (a \cdot b^2) / 2,$$

где **a** — больший, **b** — меньший линейный размер опухолевого узла.

Эффективность терапии оценивали по торможению роста опухоли. Процент торможения роста рассчитывали по формуле:

$$(V_k - V_0) / V_k \cdot 100\%,$$

где V_k — средний объем опухоли в контрольной группе, V_0 — средний объем опухоли в опытной группе.

Индекс роста опухоли (ИРО) определяли в процентах по формуле:

ИРО = $S_3 / S_k \cdot 100\%$, где S_3 — площадь под кинетической кривой роста опухоли в группе подопытных мышей, а S_k — площадь под кинетической кривой роста опухоли животных контрольной группы. То есть, чем значительнее терапевтическое действие, тем меньше ИРО. ИРО является интегральным критерием противоопухолевого эффекта, отражающим как его выраженность, так и про-

должительность [7]. Для определения площади кинетической кривой роста опухоли использовали метод трапеций, базирующийся на формуле:

$$S = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{V_i + V_{i+1}}{2} \times t_i = \frac{V_1 + V_2}{2} \times t_1 + \frac{V_2 + V_3}{2} \times t_2 + \dots + \frac{V_{n-1} + V_n}{2} \times t_{n-1},$$

* t_{n-1} , где V_i — объем опухоли в соответствующем измерении под номером i , n — число измерений, t_1 — время в сутках между 1-м и 2-м измерениями, t_2 — время в сутках между 2-м и 3-м измерениями, t_{n-1} — время в сутках между предпоследним и последним измерениями. Регистрировали сроки гибели животных. Всех животных вскрывали, отмечали наличие метастазов в легкие и простатные опухоли в органы малого таза и брюшную полость.

Опухоль перевивали животным подкожно в правый бок в количестве 0,2 мл 10% суспензии клеток (10^7 клеток/мышь), полученных путем аспирации асцитической жидкости мыши-донора (0 сутки опыта). Через 72 часа после инокуляции опухолевых клеток животные были рандомизированы по массе. Порядок присвоения номера группы был определен сгенерированными случайными числами. Животные были распределены на 5 экспериментальных групп. Мыши 1-й группы ($n = 11$) получали вместо питьевой воды деионизованную воду (марка А по ОСТ 11.029.003-80) 5 дней в неделю и служили контролем 1. 2-я группа мышей ($n = 7$) — получала вместо питьевой воды раствор препарата АКС в дозе 0,75 мг/кг/сутки 5 дней в неделю. В 3-й группе ($n = 11$) мышам вводили деионизованную воду подкожно, в область холки по 0,5 мл 3 раза в неделю, и они служили контролем 2. Мышам 4-й группы ($n = 10$) подкожно вводили препарат АКС в дозе 0,75 мг/кг 3 раза в неделю. 5-й группе мышей ($n = 10$) подкожно вводили препарат АКС в дозе 2,5 мг/кг подкожно в аналогичном режиме, как в 3-й и 4-й группах. Курс состоял из 12 инъекций препаратов в группах 3, 4 и 5.

Начиная с 7-го дня после перевивки, у мышей всех групп измеряли опухолевые узлы, вычисляли их объем ($см^3$) и оценивали эффективность терапии по торможению роста опухоли. Регистрировали сроки гибели животных. Результаты опытов были подвергнуты статистической обработке с применением критерия Стьюдента (программа MS Excel 2010). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение эффективности препарата АКС коллоидного серебра в опухолевых клеточных культурах

При культивировании использованных опухолевых линий в среде с добавлением 1,5 мг/л раствора препарата АКС наблюдалось снижение жизнеспособности клеток по сравнению с контролем (рис. 1, 2, 3). По мере увеличения концентрации препарата от 2,7; 3,9 и до 5,1 мг/л, отмечалась полная гибель клеток во всех изученных нами клеточных культурах.

Эффект препарата был более выражен в отношении линии опухоли молочной железы MDA-MB-231, что проявлялось в статистически значимом ($p < 0,01$) сокращении количества жизнеспособных клеток по сравнению с контролем, начиная с 7 суток после добавления

препарата в среду в концентрации 1,5 мг/л (рис. 1). Наши наблюдения согласуются с данными других авторов, изучавшими эффекты наночастиц серебра на аналогичной модели рака молочной железы. Так, клеточную культуру MDA-MB-231 обрабатывали различными концентрациями наночастиц серебра AgNP, синтезированных с использованием культуры бактерий *Bacillus funiculus*, что приводило к дозозависимой цитотоксичности опухолевых клеток [8]. Обнаруженный противоопухолевый эффект авторы связывают со способностью наночастиц серебра генерировать активные формы кислорода (АФК), индуцирующие апоптоз. Аналогичные результаты были получены при изучении противоопухолевого эффекта КС (AgNPs) MICRODYN [9] с использованием этой же линии рака молочной железы. Эффект AgNPs выражался в дозозависимой гибели клеток культуры по сравнению с контролем. Механизм действия был также обусловлен цитотоксическим эффектом AgNPs (MICRODYN), индуцирующим апоптоз в опухолевых клетках.

При оценке эффекта АКС в культуре HT29 — карциномы толстой кишки, как представлено на рис. 2, графики изменения оптической плотности в контрольной группе и подопытной 1,5 мг/л практически совпали, что может быть связано с особенностями роста кишечной культуры эпителиальных клеток [10]. При увеличении концентрации АКС от 2,7 до 5,1 мг/л, наблюдалось статистически значимое ($p < 0,0001$) снижение жизнеспособности опухолевых клеток толстой кишки по сравнению с контролем (рис. 2) на 4, 7, и 10 сутки после добавления препарата в культуру.

Использование фитосинтезированных наночастиц серебра в аналогичной модели рака толстой кишки свидетельствовало о цитотоксичном эффекте AgNPs [11], что может быть связано с их высокой антиоксидантной активностью.

В культуре PC3 статистически значимое подавление роста клеток рака предстательной железы также было отмечено, при использовании препарата АКС, начиная с концентрации 2,7 мг/л и более (рис. 3). Дозозависимый цитотоксический эффект на клетки культуры PC3 наблюдался при добавлении в культуру наночастиц серебра, синтезированных на основе лекарственных растений и подтверждался фрагментацией ДНК в клетках опухоли [12]. Аналогичным образом в отношении клеток рака предстательной железы действовал препарат наночастиц серебра, синтезированный из экстракта плодов *Hurphaene thebaica* [13].

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что новый препарат коллоидного бисиликата серебра АКС при использовании в кон-

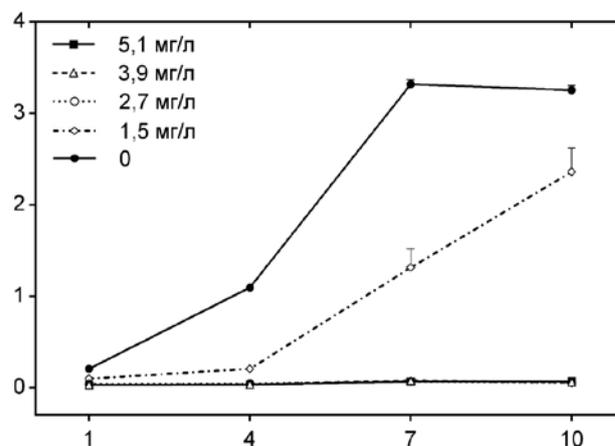


Рис. 1. Влияние различных концентраций препарата АКС на культуру клеток MDA-MB-231
По оси абсцисс: сутки после добавления препарата.
По оси ординат: оптическая плотность при 450 нм
Различия статистически значимы по сравнению с контролем (0) $p < 0,01$

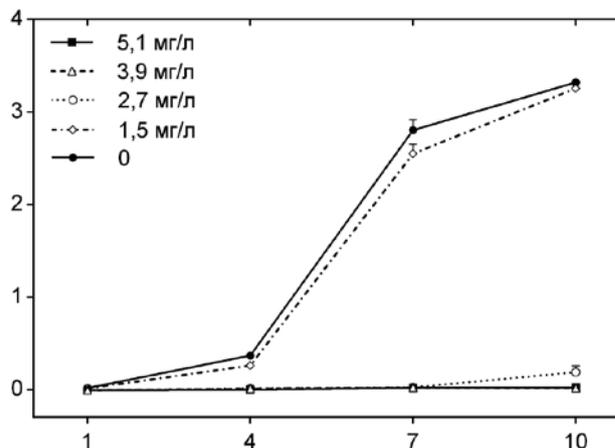


Рис. 2. Результат воздействия препарата АКС на культуру HT29.
Различия статистически значимы с контролем (0) в концентрации 1,5 мг/л только на 4 день после добавления препарата $p < 0,01$; в концентрации 2,7 мг/л и выше различия статистически значимы с контролем (0) на 4, 7 и 10 дни после добавления препарата $p < 0,0001$

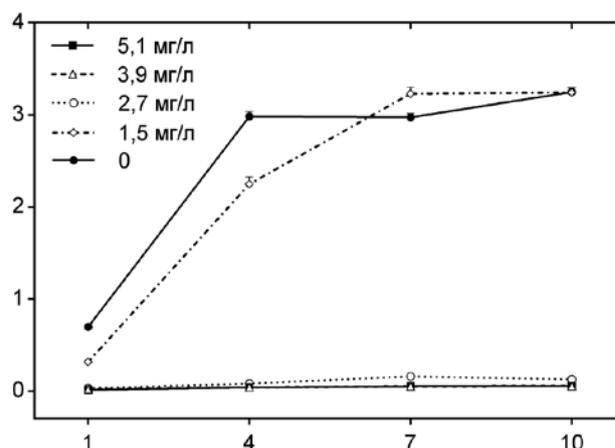


Рис. 3. Результат воздействия препарата АКС на культуру PC3.
 $p < 0,00014$ — различия статистически значимы по сравнению с контролем (0) на 7 и 10 дни после добавления препарата в концентрации 2,7 мг/л и выше

центрациях 2,7; 3,9 и 5,1 мг/л, вызывает полную гибель опухолевых клеток в клеточных линиях рака молочной железы, карциномы толстой кишки и рака предстательной железы.

Изучение противоопухолевой активности препарата коллоидного серебра у мышей с опухолью Эрлиха

К 7-му дню после перевивки опухоли на месте введения у животных всех групп сформировались опухолевые узелки. Данные о влиянии АКС и деионизированной воды на рост перевиваемой опухоли Эрлиха представлены в табл. 1.

В проведенном исследовании было установлено, что АКС (2-я группа) тормозил развитие опухоли Эрлиха на 14-й, 17-й, 24-й 28-й и 31-й дни после перевивки опухоли. Различия с контрольной (1-й группой) в эти дни были статистически значимыми ($p < 0,05$). Величина торможения роста опухоли Эрлиха в подопытной группе варьировала от 33% до 52%. В остальные дни эксперимента статистически значимых различий с контрольными показателями объема опухоли не наблюдалось.

Несмотря на имеющиеся данные о противоопухолевой активности наночастиц бисиликата серебра в экспериментах *in vitro*, малоизученными остаются проблемы безопасности для

здоровья людей и животных использования наночастиц серебра для терапии или диагностики опухоли. В исследованиях *in vivo*, оказалось, что не только доза, но и способ введения наночастиц серебра могут быть существенны для распределения, накопления и патогенных последствий, определяющих токсическое воздействие на организм [14].

Так, было показано, что низкие дозы наночастиц серебра при добавлении в диету способствовали быстрому набору веса поросят. При этом, были выявлены антимикробные свойства частиц серебра против определенных групп бактерий, что приводило, по мнению авторов исследования, к снижению микробной нагрузки в тонком кишечнике, а эффект наночастиц серебра приравнивался к действию пребиотиков [15]. В работе F. Ghanbar et al. также отмечалась выраженная антибактериальная активность наночастиц серебра в отношении ряда патогенных бактерий [16].

В отличие от низких доз наночастиц серебра, высокие (летальные и сублетальные дозы) способны вызывать значительную генерацию АФК (активные формы кислорода), приводя, в частности, к дозозависимому увеличению смертности личинок *Drosophila melanogaster* [17].

Таблица 1. Влияние препарата АКС в дозе 0,75 мг/кг/сутки и деионизированной воды при введении с питьевой водой на рост опухоли Эрлиха у мышей SHR

Группа №	Показатели	Сутки опыта							
		7	10	14	17	21	24	28	31
1 Контроль 1	Объем опухоли, см ³	0,43±0,09	0,78±0,14	1,62±0,25	2,78±0,34	4,01±0,65	6,48±1,01	8,41±1,27	10,74±1,67
	Количество животных	11	11	10	10	10	9	9	9
2 АКС	Объем опухоли, см ³	0,31±0,04	0,81±0,04	0,96±0,11*	1,86±0,16*	2,69±0,44	3,45±0,42*	4,07±0,55*	5,99±0,88*
	Количество животных	7	7	7	7	6	5	5	5
	Торможение роста опухоли, %	28%	26%	40%	33%	33%	47%	52%	44%

*- $p < 0,05$ различия статистически значимые по сравнению с контрольной группой.
Примечание: в таблице статистически значимые результаты выделены жирным шрифтом

Таблица 2. Влияние препарата АКС в дозах 0,75 и 2,5 мг/кг и деионизированной воды при инъекционном введении на рост опухоли Эрлиха у мышей SHR

Группа №	Показатели	Сутки опыта							
		7	10	14	17	21	24	28	31
3 Контроль 2	Объем опухоли, см ³	0,53±0,04	1,03±0,04	1,57±0,18	2,51±0,34	3,13±0,53	3,76±0,85	5,78±1,22	7,63±1,57
	Количество животных	11	11	11	11	11	11	11	10
4 АКС (0,75 мг/кг)	Объем опухоли, см ³	0,46±0,05	1,04±0,010	1,39±0,10	2,12±0,20	2,76±0,23	3,55±0,46	5,07±0,66	7,19±0,78
	Количество животных	10	10	10	10	10	10	9	9
	Торможение роста опухоли, %	13%	-1%	11%	15%	12%	6%	12%	6%
5 АКС (2,5 мг/кг)	Объем опухоли, см ³	0,39±0,04	0,76±0,080	1,49±0,27	1,76±0,27	2,27±0,45	3,59±0,70	4,46±0,84	6,65±1,41
	Количество животных	10	10	10	10	10	10	10	9
	Торможение роста опухоли, %	27%*	27%*	5%	30%	27%	5%	23%	13%

*- $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.
Примечание: в таблице статистически значимые результаты выделены жирным шрифтом.

Таким образом, в нашем исследовании, при введении мышам с перевиваемой опухолью Эрлиха препарата АКС (в малой дозе) с питьевой водой наблюдался противоопухолевый эффект, что выражалось в торможении роста опухоли по сравнению с контролем. Можно предположить, что в основе такого эффекта лежит способность коллоидного бисиликата серебра $Ag_6Si_2O_7$, вызывать образование АФК и усиливать апоптоз, что приводит к уменьшению числа опухолевых клеток и соответственно, торможению роста опухоли.

У животных остальных групп (3-й, 4-й и 5-й) также к 7-му дню после перевивки опухоли на месте введения сформировались опухолевые узелки. Данные о влиянии деионизованной воды (контроль 2 группа 3) и препаратов серебра АКС в дозе — 0,75 мг/кг (группа 4) и АКС в дозе — 2,5 мг/кг (группа 5) при инъекционном введении на рост перевиваемой опухоли Эрлиха приведены в таблице 2. Введение препарата АКС в дозе — 0,75 мг/кг не угнетало рост опухоли по сравнению с контролем на протяжении всего эксперимента. У животных 5-й группы, которые получали инъекции препарата АКС — 2,5 мг/кг, наблюдалось торможение роста опухоли Эрлиха на 27% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных, при оценке на 7-й и 10-й дни эксперимента, соответственно.

В другие дни опыта, например, на 17-й и 21-й, эти различия носили характер тенденции (30% и 27%, соответственно) и не достигали уровня статистической значимости.

Недавние исследования противоопухолевой активности наночастиц серебра (AgNPs) на модели перевиваемой опухоли Эрлиха показали выраженную активность этих частиц при внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг массы тела. Так, AgNPs эффективно улучшали выживаемость и уменьшали объем опухоли Эрлиха у мышей, причем существенно эффективней, чем введение доксорубина — известного противоопухолевого препарата [18]. В нашем исследовании количественно более низкое содержание наночастиц бисиликата серебра (2,5 мг/кг) приводило к торможению роста опухоли, но только в определенные сроки эксперимента.

Сравнительная оценка площади под кинетической кривой роста опухоли и индекса роста опухоли в подопытных группах при сравнении с контрольной свидетельствовала только о наличии общей тенденции к уменьшению этих показателей (табл. 3). Так в 4-й группе эта тенденция выражалась в снижении площади кинетической кривой роста опухоли в 1,1 раза и в 1,2 раза в 5-й группе по сравнению с контролем 2 (группа 3). ИРО по сравнению с контролем был на 9,7% меньше в 4-й группе и на 18,5% в 5-й группе, но эти различия не достигали уровня статистической значимости.

При вскрытии животных было отмечено прорастание опухоли в органы малого таза и брюшную полость, а в ряде случаев перевиваемая опухоль метастазировала в легкие и в регионарные и отдаленные лимфатические узлы.

По данным аутопсии в 64% случаев у мышей в контрольной группе наблюдались метастазы. У мышей 5-й группы подобное распространение опухоли было отмечено только в 20% случаев по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (табл. 3).

Таблица 3. Влияние препарата АКС в дозах 0,75 и 2,5 мг/мышь на площадь под кинетической кривой роста и индекс роста опухоли (ИРО) и метастазирование перевиваемой опухоли Эрлиха

Группа	Воздействия	Площадь под кинетической кривой роста опухоли (см ²)	ИРО%	Число животных с метастазами/общее число мышей в опыте (%)
3	Контроль 2	74,47±9,29	100	7/11 (64)
4	АКС (0,75 мг/кг)	67,24±7,06	90,3	6/10 (60)
5	АКС (2,5 мг/кг)	60,73±11,08	81,5	2/10 (20) *

* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Таким образом, было установлено, что при инъекционном введении препарат АКС в дозе 2,5 мг/кг обладает умеренной противоопухолевой активностью в отношении солидной карциномы Эрлиха, что выражалось в торможении роста опухоли и развития метастазов. Результаты наших опытов свидетельствуют, что противоопухолевый эффект коллоидного бисиликата серебра $Ag_6Si_2O_7$ зависит как от дозы препарата, так и от способа введения. Дальнейшие исследования будут сосредоточены на изучении механизма противоопухолевого действия $Ag_6Si_2O_7$, а также на оценке его активности на различных моделях экспериментальных опухолей, например, у трансгенных мышей с высокой частотой рака молочной железы.

Заключение

Наши результаты показали, что применение коллоидного раствора бисиликата серебра — АКС является эффективным в блокировании роста различных клеточных опухолевых культур, а на модели перевиваемого рака АКС тормозит рост новообразования. Кроме того, АКС обладает дозозависимым противоопухолевым эффектом, что было обнаружено в опытах *in vitro* и *in vivo*. Дальнейшие исследования позволят изучить противоопухолевый механизм действия АКС.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА

- Huang HC, Barua S, Sharma G, et al. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Journal of Controlled Release*. 2011; 155: 344–57.
- Tomankova K, Horakova J, Harvanova M, et al. Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*. 2015; 82:P:106–15. doi:10.1016/j.fct.2015.03.027.
- Poulose S, Panda T, Nair PP, Théodore T. Biosynthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2014; 14(2): 2038-49.
- Байдакова М.В., Германов Н.А., Голяндин С.Н., Компан М.Е., Мочалов С.В., Нащекин А.В., Неведомский В.Н., Пульнев С.А., Рабчинский М.К., Улин В.П., Улин Н.В. Слабоупорядоченный наноструктурированный бисиликат серебра и его коллоидные растворы: получение и свойства // Журнал технической физики. — 2019. — Т. 89. — Вып. 6. — С. 944-953. [Baidakova MV, Germanov NA, Goliandin SN, Kompan ME, Mochalov SV, Naschekin AV, Nevedomsky VN, Pulnev SA, Rabchinsky MK, Ulin VP, Ulin NV. Weakly ordered nanostructured silver bisilicate and its colloidal solutions: preparation and properties. *Journal of Technical Physics*. 2019; 89(6):944-53. (In Russ)] doi: 10.21883/0000000000.
- 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2001; 218(5): 669-96.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М: Гриф и К, 2012. — 944 с. ISBN 978-5-8125-1466-3. [Guidelines for conducting pre-clinical tests of drugs. Ed. A.N. Mironov. M: Grif & K. 2012: 944p. (In Russ)].
- Стуков А.Н., Коньков С.А., Иванова М.А., Никитин А.К., Сорокин Г.М. Индекс роста опухоли как интегральный критерий эффективности противоопухолевой терапии в эксперименте // Вопросы онкологии. — 2001. — Т.47. — № 5. — С. 616-618. [Stukov AN, Konkov SA, Ivanova MA, Nikitin AK, Sorokin GM. Tumor growth index as an integral criterion for the effectiveness of antitumor therapy in the experiment. *Voprosy onkologii*. 2001; 47(5): 616-18. (In Russ)].
- Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, et al. Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *BioMed Research International*. 2013; Article ID 535796, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/535796>.
- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Sierra-Rivera CA, et al. Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*.2010; 16: 148-54. doi: 10.1186/1756-9966-29-148.
- Costello CM, Hongpeng J, Shaffiey S, et al. Synthetic small intestinal scaffolds for improved studies of intestinal differentiation. *Biotechnology and Bioengineering*.2014; 111(6):1222-32. doi: 10.1002/bit.25180.
- Chengzheng W, Jiazhi W, Shuangjiang C, et al. Biogenic Synthesis, Characterization and Evaluation of Silver Nanoparticles from *Aspergillus niger* JX556221 Against Human Colon Cancer Cell Line HT-29. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018; 18(5): 3673-368. doi: 10.1166/jnn.2018.15364.
- Prasannaraj G, Sahi SV, Ravikumar S, Venkatachalam P. Enhanced Cytotoxicity of Biomolecules Loaded Metallic Silver Nanoparticles Against Human Liver (HepG2) and Prostate (PC3) Cancer Cell Lines. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2016; 16(5): 4948-959.
- Bello BA, Khan SA, Khan JA, et al. Anticancer, antibacterial and pollutant degradation potential of silver nanoparticles from *Hyphaene thebaica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017; 490(3): 889-94. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.136.
- Raies AB, Bajic VB. *In silico* toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. 2016; 6: 147–72.
- Fondevila M, Herrero R, Casallasa L, et al. Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*.2009; 150: 259-69.
- Ghanbar F, Mirzaie A, Ashrafi F, et al. Antioxidant, antibacterial and anticancer properties of phyto-synthesised *Artemisia quttensis* Podlech extract mediated AgNPs. *IET Nanobiotechnol*. 2017; 11(4): 485-92. doi: 10.1049/iet-nbt.2016.0101.
- Mao BH, Chen ZY, Wang YJ, Yan SJ. Silver nanoparticles have lethal and sublethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated stress responses. *Scientific Reports*. 2018; 8(1): 2445. doi: 10.1038/s41598-018-20728-z.
- Mansour HH, Eid M, El-Arnaouty MB. Effect of silver nanoparticles synthesized by gamma radiation on the cytotoxicity of doxorubicin in human cancer cell lines and experimental animals. *Human & Experimental Toxicology*. 2018; 37(1): 38-50. doi: 10.1177/0960327116689717.

Поступила в редакцию 21.08.2019 г.

M.L. Tyndyk¹, I.G. Popovich¹, A.B. Malek¹,
R.B. Samsonov¹, N.A. Germanov², S.N. Goliandin^{2,3},
S.V. Mochalov², S.A. Pulnev², V.N. Anisimov¹

Antitumor effect of colloidal silver bisilicate in experimental *in vitro* and *in vivo* studies

¹Federal State Budgetary Institution «N.N. Petrov National Medical Research Centre of Oncology» Ministry of healthcare of Russian Federation,
²LLC «Nanometall»,

³A.F. Ioffe Physico-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

The paper presents the results of the research on the antitumor activity of a new drug — atomic clusters of silver (ACS), the colloidal solution of nanostructured silver bisilicate Ag₆Si₂O₇ with particles size of 1-2 nm in deionized water. *In vitro* studies to evaluate the effect of various ACS concentrations in human tumor cells cultures (breast cancer, colon carcinoma and prostate cancer) were conducted. The highest antitumor activity of ACS was observed in dilutions from 2.7 mg/l to 5.1 mg/l, resulting in the death of tumor cells in all studied cell cultures. *In vivo* experiments on transplanted Ehrlich carcinoma model in mice consuming 0.75 mg/kg ACS with drinking water revealed significant inhibition of tumor growth since the 14th day of experiment (maximally by 52% on the 28th day, p<0.05) in comparison with control. Subcutaneous injections of 2.5 mg/kg ACS inhibited Ehrlich's tumor growth on the 7th and 10th days of the experiment (p <0.05) as compared to control.

Key words: colloidal silver bisilicate, antitumor activity, tumor cells cultures, transplanted Ehrlich carcinoma