

## Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-009.8

DOI 10.37469/0507-3758-2021-67-5-724-730

Вопросы онкологии, 2021. Том 67, № 5

*А.В. Щербанюк<sup>1</sup>, С.И. Моисеев<sup>1</sup>, Н.В. Бычкова<sup>1,2</sup>, Н.А. Германов<sup>3</sup>, С.Н. Голядин<sup>3</sup>,  
В.П. Улин<sup>3</sup>, Н.В. Улин<sup>3</sup>, Н.В. Калмыкова<sup>1</sup>*

### Клетки миеломной линии RPMI8226 и нормальные клетки человека имеют разную чувствительность к наночастицам бисиликата серебра *in vitro*

<sup>1</sup> ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> ФБГОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»

<sup>3</sup> ФГБУН «Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук», Санкт-Петербург

**Введение.** Наночастицы серебра и его соединений рассматривают как перспективного агента противоопухолевой терапии из-за выраженного цитотоксического эффекта. Определение дифференциальной чувствительности опухолевых и нормальных клеток к действию наночастиц серебра может быть основой для их использования в качестве вспомогательного средства при терапии онкологических заболеваний.

**Цель.** Изучить влияние атомных кластеров серебра (АКС) в виде коллоидного раствора наноструктурированного бисиликата серебра  $Ag_6Si_2O_7$  на жизнеспособность и пролиферацию клеток миеломной линии RPMI8226 и нормальных клеток человека двух типов: мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и лимфоцитов периферической крови.

**Методы.** Оценку цитотоксичности АКС проводили с помощью МТТ и ЛДГ-тестов. Для изучения пролиферативной активности клеток использовали метод проточной цитофлуориметрии.

**Результаты.** Показано, что препарат АКС проявляет цитотоксический дозозависимый эффект по отношению ко всем типам изученных в данной работе клеток, однако нормальные и опухолевые клетки значительно различаются по чувствительности к действию АКС. Для клеток миеломной линии RPMI8226 ингибирующая доза IC50 (концентрация, при которой жизнеспособность снижается на 50%) составляет 1,75 мкг/мл АКС. Для МСК разного происхождения IC50 лежит в диапазоне концентраций 12–16 мкг/мл. Препарат АКС в концентрациях 2–3 мкг/мл через 24 ч вызывает гибель клеток миеломной линии, но не влияет на показатели жизнеспособности и пролиферацию МСК и лимфоцитов периферической крови.

**Выводы.** Установлен оптимальный диапазон концентраций препарата АКС (2–3 мкг/мл), при котором выявлен противоопухолевый эффект в отношении миеломных клеток RPMI8226 *in vitro* без цитотоксического воздействия на нормальные клетки человека.

**Ключевые слова:** наночастицы серебра; цитотоксичность; пролиферация; множественная миелома

#### Введение

Препараты наносеребра и его соединений рассматривают как перспективных агентов в терапии опухолевых заболеваний, поскольку вызываемые ими цитотоксические эффекты могут быть направлены против опухолевых клеток [1, 2]. Основным вероятным механизмом цитотоксичности наночастиц серебра является вызываемый ими окислительный стресс [3]. Продукция активных форм кислорода (АФК) приводит к повреждению ДНК, вызывая нарушение пролиферативной активности клетки, апоптоз и некроз [4–7]. Хотя основным действующим агентом наночастиц серебра является катион серебра, биологическая активность наночастиц зависит от их физико-химических показателей: химического состава поверхности наночастиц, реакционной способности в растворе, эффективности высвобождения ионов серебра, морфологии и размера наночастиц [2, 3, 8, 9]. В литературе есть примеры того, что нормальные клетки менее чувствительны к цитотоксическому действию наночастиц серебра, чем опухолевые клетки, в то же время те и другие клетки не различаются по чувствительности к цитотоксическому действию катиона серебра [6, 11–13]. Таким образом, для каждого конкретного вида наночастиц серебра требуется отдельное исследование.

Противоопухолевая активность атомных кластеров серебра (АКС) была ранее показана *in vitro* на культурах клеток опухолей человека и *in vivo* на модели перевиваемой опухоли Эрлиха [10]. Однако остается открытым вопрос о влиянии АКС на нормальные клетки в концентрациях, токсичных для опухолевых клеток. Идентификация дифференциальной чувствительности опухолевых клеток к АКС по сравнению с нормальными клетками поможет установить «терапевтическое окно» — интервал концентраций наночастиц для их использования в качестве средства в лечении онкологических заболеваний.

В представленном исследовании произведено сравнение влияния АКС на нормальные и трансформированные клетки на клеточной модели миеломы человека. Множественная миелома является некурабельным злокачественным заболеванием системы крови, в основе которого лежит пролиферация клона плазматических клеток, формирующегося из В-лимфоцитов. В костном мозге миеломные клетки находятся в тесном контакте с элементами стромы, в частности, с мезенхимальными стромальными клетками (МСК), которые участвуют в поддержании гомеостаза в норме и при патологии. В настоящее время частота достижения ремиссий при проведении первичной противомиеломной терапии достигает в среднем 85%. Однако множественная миелома, несмотря на использование высокоэффективных лекарственных препаратов и их комбинаций, остается хроническим неизлечимым заболеванием, характеризующимся рецидивирующим течением. Именно поэтому поиск новых средств остается актуальным. В нашей работе исследована дозозависимая цитотоксичность АКС на клетки миеломной линии человека RPMI8226 и на нормальные клетки человека костномозгового происхождения (МСК и лимфоциты периферической крови).

## Материалы и методы

**Получение АКС.** Коллоидный раствор наноструктурированного бисиликата серебра размером частиц 1–2 нм в деионизованной воде впервые получен в ФТИ им А.Ф.Иоффе РАН [14]. Частица представляет собой нанокompозит, состоящий из ядра  $Ag_6Si_2O_7$ , окруженного гелеобразной оболочкой из частично ионизированных гидратированных молекул поликремниевых кислот  $[-SiO_3H_2]_n^- \cdot mH_2O$ , которая обеспечивает повышенную стабильность частиц в биологических средах.

**Клеточные культуры.** Клетки миеломной линии человека RPMI8226 были получены из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Источником линии RPMI8226 были В-лимфоциты периферической крови больного с множественной миеломой. Клетки культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят (Биолот, Россия). Две линии МСК человека выделены из пунктата костного мозга (здорового донора — линия M032, и больного множествен-

ной миеломой — линия M022), одна линия (M002) получена из жировой ткани здорового донора. МСК получали из мононуклеарной фракции методом адгезии к поверхности культуральной посуды и культивировали в специализированной среде Mesencult (StemCellTechnologies, Канада). В работе использованы клетки 4–6 пассажей.

Лимфоциты периферической крови получены из мононуклеарной фракции, которую выделяли из периферической крови троих здоровых лиц. Отсутствие нарушений показателей клеточного иммунитета у доноров крови подтверждали на основании оценки субпопуляционного состава лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии (Navios, Beckman Coulter, США). Весь клинический материал предоставлен в ходе проведения планового процедур после подписания информированного согласия.

**Оценка цитотоксичности АКС.** Цитотоксичность АКС оценивали двумя методами: 1) по изменению активности митохондриальных дегидрогеназ в тесте с метилтетразолием (МТТ, Sigma–Aldrich, США); 2) по активности в среде культивирования цитозольного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ, Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit, Thermo scientific, США). Для этого клетки в логарифмической фазе роста высевали в 96-луночные платы (Nunc, Дания) в количестве  $50 \times 10^3$  клеток линии RPMI8226 и  $4 \times 10^3$  МСК на 1 лунку в 100 мкл соответствующей культуральной среды. В случае клеток линии RPMI8226 сразу после нанесения клеток в 96-луночную плату добавляли в среду культивирования растворы АКС в культуральной среде в необходимой концентрации (10% от объема). В случае линий МСК клетки перед добавлением АКС оставляли на 24 ч для адгезии и распластывания. Затем инкубировали с АКС в течение 24 ч, после чего проводили реакцию выявления окраски в соответствии с инструкциями к наборам. Измерение оптической плотности растворов производили на спектрофотометре (Multilabel reader, Perkin Elmer, США) при длине волны 540 нм (для МТТ-теста) и 490 нм (для ЛДГ-теста).

В МТТ-тесте количество живых клеток определяли по калибровочной кривой в соответствии со значением оптической плотности окрашенного раствора в лунках и выражали в процентах относительно контроля (жизнеспособность клеток, %). В ЛДГ-тесте значение цитотоксичности (%) высчитывали по формуле:

Процент цитотоксичности =  $[(\text{АКС-индуцированная ЛДГ активность} - \text{спонтанная ЛДГ активность}) / (\text{максимальная ЛДГ активность} - \text{спонтанная ЛДГ активность})] \times 100$ .

Все расчеты по результатам МТТ и ЛДГ-тестов делали на основании данных 3 независимых экспериментов.

**Оценка клеточной пролиферации.** Кинетику клеточной пролиферации МСК определяли методом проточной цитофлуориметрии посредством измерения содержания ДНК в окрашенных ядрах в двух вариантах: сразу после 24-часового воздействия АКС в концентрациях 2 и 3 мкг/мл и через 24 ч после прекращения воздействия АКС (48 ч от начала эксперимента и внесения АКС). Плотность посева клеток в культуральных флаконах (Nunc, Дания) составила  $6 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>.

Лимфоциты периферической крови в количестве  $50 \times 10^3$  клеток на лунку инкубировали в течение 24 ч в 96-луночной плате с преимущественно Т-клеточным митогеном фитогемагглютинином (ФГА) в концентрации 15 мкг/мл (Sigma, США, контроль), а также одновременно с ФГА и АКС в концентрации 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл и 3 мкг/мл. В пробах оценивали распределение клеток по фазам жизненного цикла методом проточной ДНК-цитофлуориметрии.

Окрашивание клеток для анализа ДНК включало использование детергента 1% тритона X-100 (ICN Biomedicals, Германия), флуоресцентного красителя 1% бромистого этидия (Sigma, США) в присутствии 1% рибонуклеазы А (Sigma, США) в течение 30 мин при 4 °С. После окрашивания пробы оценивали на проточном цитометре Cytoomics

FC500 (Beckman Coulter, США), соблюдая правила регистрации, анализа и интерпретации ДНК-гистограмм [15]. В каждой пробе оценивали 5 тысяч событий.

Оценку ДНК-гистограмм проводили в программе математической обработки данных MultiCycle AV for Windows version 328 USB (DNA Cell Cycle Analysis Software, Phoenix Flow Systems), которая позволяет рассчитать количество клеток в G<sub>1</sub>, S и G<sub>2</sub>/M фазах клеточного цикла. Индекс пролиферации (%) вычисляли как сумму клеток, находящихся в синтетической, постсинтетической фазах и в митозе.

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 10.0 с использованием параметрических критериев. Результаты представлены в виде значений средних арифметических и стандартных отклонений (mean±SD). Различия считали статистически значимыми при критерии p<0,05.

### Результаты

**Цитотоксическое действие АКС на клетки линии RPMI8226.** Было установлено, что препарат АКС обладает высокой степенью токсичности по отношению к опухолевым клеткам миеломной линии RPMI8226. После 24-часового воздействия препарата наблюдали резкое снижение жизнеспособности клеток в узком диапазоне концентраций АКС: при 1,5 мкг/мл — 84,7% живых клеток, а уже при 2–3 мкг/мл наблюдали почти полную гибель клеток (1–0% живых клеток) (рис. 1). Значение IC<sub>50</sub> для АКС по отношению к миеломным клеткам составило

1,75 мкг/мл. Образующие оболочку наночастиц поликремниевые кислоты в тех же концентрациях, что и АКС, цитотоксического действия не оказывали.

По результатам ЛДГ-теста также наблюдали дозозависимый характер развития цитотоксичности (табл. 1): при концентрации АКС 1 мкг/мл — 6,6% цитотоксичности; 2 мкг/мл — 11,9%; 3 мкг/мл — 38,2% цитотоксичности. По ЛДГ-тесту значение IC<sub>50</sub> не определяется в интервале исследованных концентраций АКС (1–3,0 мкг/мл).

**Цитотоксическое воздействие АКС на линии МСК человека.** Снижение жизнеспособности клеток линии M032 по результатам МТТ-теста имело дозозависимый характер и началось при концентрации АКС 8,0 мкг/мл (89,7% живых клеток). Значение IC<sub>50</sub> составило 15,0 мкг/мл (рис. 2). Раствор поликремниевых кислот в том же диапазоне концентраций, что и АКС (8,0–16,0 мкг/мл), вызывал дозозависимое снижение жизнеспособности клеток на 10–20%. У других протестированных линий МСК (M022 и M002) ответ на воздействие АКС был похожим: значение IC<sub>50</sub> определялось в диапазоне 12,0–16,0 мкг/мл (рис. 3).

Результаты ЛДГ-теста для линии M032 показали, что в отличие от клеток линии RPMI8226, значения цитотоксичности в диапазоне концентраций АКС 1–3 мкг/мл не отличались от контроля (см. табл. 1).

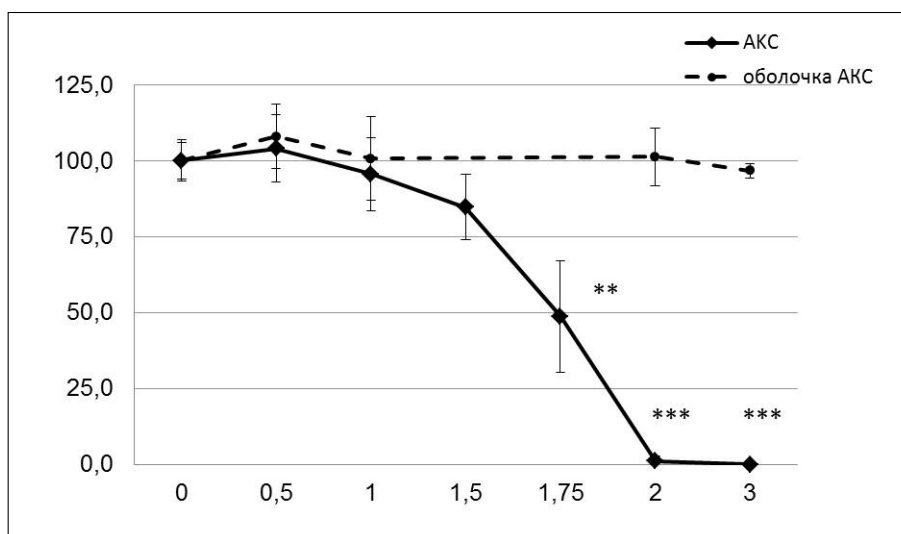


Рис. 1. Оценка жизнеспособности клеток миеломной линии RPMI8226 после инкубации с АКС и компонентами оболочки АКС в течение 24 ч МТТ-тестом, значения (mean±SD) статистически отличаются от контроля при \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. По оси абсцисс: концентрация АКС, мкг/мл; по оси ординат: количество живых клеток, % от контроля

**Таблица 1. Оценка цитотоксичности АКС ЛДГ-тестом после воздействия на RPMI8226 и МСК в течение 24 ч, %, mean±SD**

Концентрация АКС, мкг/мл	0	1	2	3
Линии клеток				
RPMI8226	1,9±0,51	6,6±0,85*	11,9±2,77*	38,2±2,6*
МСК (M032)	4,2±0,81	4,7±0,51	3,7±0,47	4,0±0,54

\* p<0,001 (по сравнению с контролем).

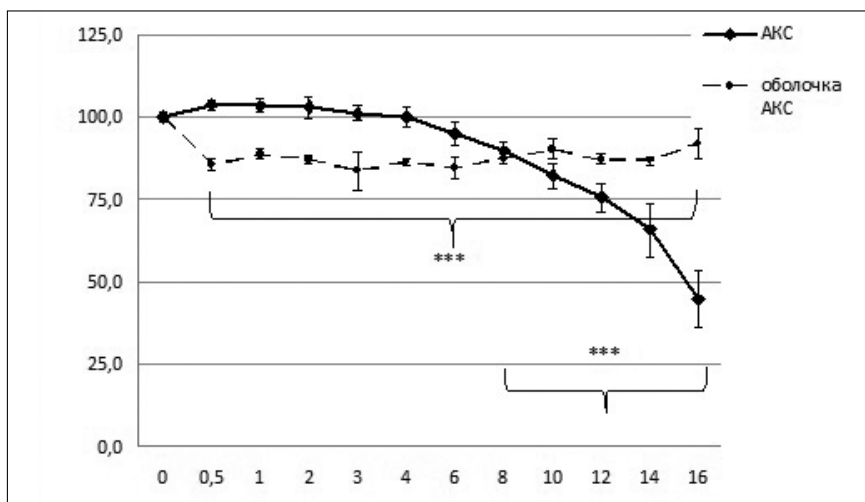


Рис. 2. Оценка жизнеспособности МСК костного мозга (линия M032, здоровый донор) после инкубации с АКС и компонентами оболочки АКС в течение 24 ч МТТ-тестом, значения (mean±SD) статистически отличаются от контроля при \*\*\* p<0,001. По оси абсцисс: концентрация АКС, мкг/мл; по оси ординат: количество живых клеток, % от контроля

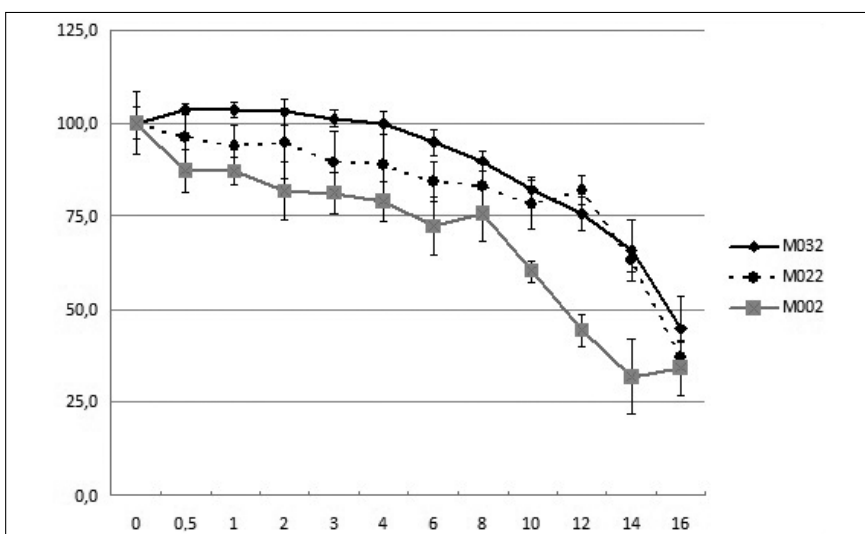


Рис. 3. Оценка жизнеспособности МСК разного происхождения после инкубации с АКС в течение 24 ч МТТ-тестом. M032 (костный мозг, здоровый донор); M022 (костный мозг, больной ММ); M002 (жировая ткань, здоровый донор). По оси абсцисс: концентрация АКС, мкг/мл; по оси ординат: количество живых клеток, % от контроля

**Таблица 2. Распределение клеток МСК (линия M022) по фазам клеточного цикла при инкубации в течение 24 ч с АКС (24 ч) и последующей инкубации в течение 24 ч без АКС (48 ч), % от общего количества клеток**

Условия культивирования	G1	S	G2/M	Индекс пролиферации
Контроль 24 ч	73,4±7,7	12,1±3,3	14,5±5,1	26,5
Контроль 48 ч	72,7±6,8	13,5±3,7	13,8±3,6	27,3
АКС 2 мкг/мл 24 ч	73,0±8,5	12,0±4,1	15,0±5,7	27,0
АКС 2 мкг/мл 48 ч	70,6±5,8	14,8±0,7	14,6±6,1	29,4
АКС 3 мкг/мл 24 ч	73,6±9,1	10,9±3,4	15,5±5,7	26,4
АКС 3 мкг/мл 48 ч	71,3±5,2	12,7±2,3	16,1±3,2	28,8

**Таблица 3. Распределение лимфоцитов по фазам клеточного цикла при совместной инкубации с ФГА и АКС в течение 24 ч, % от общего количества клеток**

Условия культивирования	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	Индекс пролиферации
Контроль (ФГА)	86,7±0,8	9,6±0,2	3,7±0,8	13,3
ФГА+АКС 0,5 мкг/мл	88,5±1,3	7,7±1,7	3,8±0,8	11,5
ФГА+АКС 1 мкг/мл	86,7±1,1	10,5±1,8	2,9±0,9	13,3
ФГА+АКС 2 мкг/мл	87,7±1,1	8,8±1,6	4,0±0,3	12,3
ФГА+АКС 3 мкг/мл	87,9±1,0	9,2±1,2	3,0±0,9	12,1

*Влияние АКС на пролиферативную активность МСК.* Оценка распределения по фазам жизненного цикла МСК была проведена на одной из линий МСК (M022) при концентрациях АКС 2 и 3 мкг/мл, токсичных для миеломной линии. Показано, что присутствие АКС в среде культивирования в данных концентрациях не влияет на пролиферативную активность МСК (табл. 2): после 24-часового воздействия АКС относительное количество клеток в фазе синтеза S и фазах G<sub>2</sub>/M (индекс пролиферации) не отличалось от контроля. Также не произошло изменения индекса пролиферации в последующие 24 ч после удаления АКС из среды.

*Влияние АКС на пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови.* Поскольку у здоровых людей делящиеся клетки в периферической крови практически не выявляются, изменение пролиферативной активности лимфоцитов под воздействием АКС было изучено на фоне добавления митогена ФГА. В результате исследования было показано, что препарат АКС в диапазоне концентраций 0,5–3,0 мкг/мл не изменял распределение лимфоцитов по фазам жизненного цикла и не влиял на индекс пролиферации лимфоцитов (табл. 3).

### Обсуждение

Сравнение показателей цитотоксичности АКС в отношении клеток миеломной линии RPMI8226, полученные МТТ и ЛДГ-тестами, выявило наличие между ними обратной зависимости: снижение митохондриальной активности клеток, которую отражает МТТ-тест, сопровождалось нарастанием активности фермента ЛДГ во внеклеточной среде (см. рис. 1, табл. 1). Этот факт указывает на одновременное развитие двух процессов: угнетение энергетического метаболизма и повышение степени проницаемости мембраны, что ведет к некрозу клеток при концентрациях АКС 2–3 мкг/мл. Развитие этих процессов происходит стремительно в узком диапазоне концентраций. Раствор поликремниевых кислот, составляющих оболочку АКС, не проявлял цитотоксических свойств. Таким образом, цитотоксические свойства АКС определяются целостной наноконструктивной структурой, а не отдельными составляющими, что подтверждают и литературные данные [3].

Стромальные клетки оказались в несколько раз менее чувствительны к действию АКС, чем миеломные клетки. Снижение жизнеспособности МСК по результатам МТТ-теста происходило не резко, а постепенно (см. рис. 3). По результатам ЛДГ-теста цитотоксичность АКС в отношении МСК не обнаружена. Известно, что механизм действия наночастиц серебра связы-

вают с развитием окислительного стресса и образованием АФК [8, 16]. Результаты наших исследований подтверждают обнаруженную ранее способность МСК к высокой степени антиоксидантной защиты [16]. В этом ключе становится понятной наблюдаемая в нашей работе более высокая степень устойчивости МСК к действию АКС по сравнению с линией RPMI8226. Причем МСК из разных источников (костный мозг, жировая ткань) показывают одинаковую степень чувствительности, что говорит об их общих свойствах. Цитотоксичность наночастиц серебра по отношению к МСК по литературным данным также зависит от дозы и времени воздействия [17–19]. Так, в одной из работ наночастицы серебра в диапазоне концентраций 25–50 мкг/мл после 24-часового воздействия вызывали апоптоз и некроз МСК, а в диапазоне концентраций 5–10 мкг/мл при длительном воздействии не влияли на жизнеспособность и дифференцировочный потенциал МСК [19]. Препарат АКС по результатам МТТ-теста также продемонстрировал дозозависимый характер действия на МСК в интервале концентраций 8–16 мкг/мл, но при концентрациях 1–8 мкг/мл, которые являются токсичными для миеломных клеток, цитотоксический эффект отсутствовал. Цитотоксичность может проявляться также и на уровне нарушения регуляции деления клеток, что в дальнейшем может привести к старению и гибели клеточной популяции. Поэтому мы провели оценку пролиферативной активности МСК после обработки АКС методом цитофлуориметрии. Неблагоприятного воздействия АКС не было обнаружено.

Такой же дозозависимый тип ответа на наносеребро описывается в литературе и в отношении лимфоцитов мононуклеарной фракции крови: наличие цитотоксического эффекта наблюдали при концентрациях выше 25 мкг/мл, а при концентрации ниже 25 мкг/мл влияние на пролиферацию отсутствовало [20]. В нашей работе препарат АКС в концентрациях 1–3 мкг/мл, токсичных для клеток линии RPMI8226, не оказал влияния, так же как и в случае с МСК, на пролиферативную активность лимфоцитов.

В различных исследованиях уже имеются данные о том, что порог чувствительности к наночастицам серебра для опухолевых клеток может быть ниже, чем для нормальных [11–13, 21–23]. Так, для клеток плоскоклеточного рака полости рта (линия HSC-4) IC50 составил 1,61 мкг/мл, а для нормальных клеток линии 3T3-L1 даже при концентрации 3 мкг/мл цитотоксического действия не наблюдалось [21]. В другой работе [22] для клеток фибросаркомы человека (линия HT-1080) и карциномы шейки матки (линия A431) цитотоксические эффекты (IC50) были зафиксированы при 10,6 и 11,6 мкг/мл, соот-

ветственно, а для первичных фибробластов и печеночных клеток мышей Swiss albino эффект (IC50) наступал только при 61,0 и 449,0 мкг/мл соответственно [12]. Одной из причин такого различия может быть быстрая деградация наночастиц в опухолевых клетках с высвобождением катиона серебра, который запускает образование различных АФК, в то время как в нормальных клетках наночастицы остаются интактны [11]. В связи с выделением большого количества АФК в клетках быстро истощаются запасы антиоксидантов, что и приводит к гибели раковой клетки от окислительного стресса.

В нашем случае препарат АКС в диапазоне концентраций 2–3 мкг/мл, цитотоксичных для клеток миеломной линии RPMI8226, также не влиял на жизнеспособность и пролиферацию нормальных клеток человека (МСК и лимфоцитов периферической крови).

### Заключение

В работе было показано, что наночастицы бисиликата серебра (препарат АКС) при концентрациях 2–3 мкг/мл вызывают гибель клеток миеломной линии RPMI8226, но не влияют на жизнеспособность и пролиферативную активность нормальных МСК и лимфоцитов периферической крови человека. Препарат АКС представляется перспективным для дальнейшего изучения в качестве средства противоопухолевой терапии.

#### Вклад авторов:

Щербанюк А.Щ. — получение и анализ данных по цитотоксичности препарата, написание текста рукописи;

Бычкова Н.В. — получение и анализ данных по пролиферативной активности клеток;

Калмыкова Н.В. — разработка общего дизайна исследования, написание текста рукописи;

Моисеев С.И. — общее руководство проектом, анализ данных;

Германов Н.А., Голяндин С.Н., Улин В.П., Улин Н.В. — получение препарата и его анализ.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

#### Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Станишевская И.Е., Стойнова А.М., Марахова А.И. и др. Наночастицы серебра: получение и применение в медицинских целях // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016;1(14):66–69 [Stanishevskaya I.E., Stoinova A.M., Marakhova A.I. Silver nanoparticles: preparation and use for medical purposes // Razrbotka i registratsiya ltkarstvennykh sredstv. 2016;1(14):66–69. (In Russ.)].
2. Zhang XF, Liu ZG, Shen W et al. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches // Int J Mol Sci. 2016;17(9):1534. <https://doi:10.3390/ijms17091534>
3. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species // J Phys Chem B. 2008;112(43):13608–13619. <https://doi:10.1021/jp712087m>
4. Butler KS, Peeler DJ, Casey BJ et al. Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity // Mutagenesis. 2015;30(4):577–591. <https://doi:10.1093/mutage/gev020>
5. Gurunathan S, Qasim M, Park C. Cytotoxic potential and Molecular Pathway Analysis of Silver Nanoparticles in Human Colon Cancer Cells HCT116 // Int J Mol Sci. 2018;19(8):2269. <https://doi:10.3390/ijms19082269>
6. Gurunathan S, Jeong JK, Han JW et al. Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in Helicobacter pylori, Helicobacter felis, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells // Nanoscale Res Lett. 2015;10:35. <https://doi:10.1186/s11671-015-0747-0>
7. Majeed S, Aripin FHB, Shoeb NSB et al. Bioengineered silver nanoparticles capped with bovine serum albumin and its anticancer and apoptotic activity against breast, bone and intestinal colon cancer cell lines // Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019;102:254–263. <https://doi:10.1016/j.msec.2019.04.041>
8. Xiao H, Chen Y, Alnaggar M. Silver nanoparticles induce cell death of colon cancer cells through impairing cytoskeleton and membrane nanostructure // Micron. 2019;126:102750. <https://doi:10.1016/j.micron.2019.102750>
9. Graf C, Nordmeyer D, Sengstock C et al. Shape-Dependent Dissolution and Cellular Uptake of Silver Nanoparticles // Langmuir. 2018;34(4):1506–1519. <https://doi:10.1021/acs.langmuir.7b03126>
10. Тындык М.Л., Попович И.Г., Малек А.В. и др. Изучение противоопухолевого эффекта коллоидного бисиликата серебра в экспериментах in vitro и in vivo // Вопросы онкологии. 2019;65(5):760–765 [Tyndyk M.L., Popovich I.G, Malek A.B. et al. Antitumor effect of colloidal silver bisilicate in experimental in vitro and in vivo studies // Voprosy onkologii. 2019;65(5):760–765 (In Russ.)].
11. Swanner J, Fahrenholtz CD, Tenvooren I et al. Silver nanoparticles selectively treat triple-negative breast cancer cells without affecting non-malignant breast epithelial cells in vitro and in vivo // FASEB Bioadv. 2019;1(10):639–660. <https://doi:10.1096/fba.2019-00021>
12. Arora S, Jain J, Rajwade JM et al. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells // Toxicol Appl Pharmacol. 2009;236(3):310–318. <https://doi:10.1016/j.taap.2009.02.020>
13. Байдакова М.В., Германов Н.А., Голяндин С.Н. и др. Слабоупорядоченный наноструктурированный бисиликат серебра и его коллоидные растворы: получение и свойства // Журнал технической физики. 2019;89(6):944–53. <https://doi:10.21883/0000000000> [Baidakova MV, Germanov NA, Goliandin SN et al. Weakly ordered nanostructured silver bisilicate and its

- colloidal solutions: preparation and properties // Journal tekhnicheskoi fiziki. 2019;89(6):944–953 (In Russ.). <https://doi.org/10.21883/000000000000>].
14. Бычкова Н.В. Анализ содержания ДНК методом точной цитометрии. Возможности применения в клинической практике. Тверь: ООО «Издательство «Три-ада», 2015.
  15. Valle-Prieto A, Conget PA. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress // *Stem Cells Dev.* 2010;19(12):1885–1893. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0093>
  16. Greulich C, Kittler S, Epple M et al. Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs) // *Langenbecks Arch Surg.* 2009;394(3):495–502. <https://doi.org/10.1007/s00423-009-0472-1>
  17. Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M et al. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells // *Toxicol Lett.* 2011;201(1):27–33. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.001>
  18. He W, Kienzle A, Liu X et al. In Vitro Effect of 30 nm Silver Nanoparticles on Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells // *J Biomed Nanotechnol.* 2016;12(3):525–35. <https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2182>
  19. Greulich C, Diendorf J, Gessmann J et al. Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles // *Acta Biomater.* 2011;7(9):3505–3514. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.030>
  20. Yakop F, Abd Ghafar SA, Yong YK et al. Silver nanoparticles Clinacanthus Nutans leaves extract induced apoptosis towards oral squamous cell carcinoma cell lines // *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(supl. 2):131–139. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1452750>
  21. Arora S, Jain J, Rajwade JM et al. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies // *Toxicol Lett.* 2008;179(2):93–100. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.04.009>
  22. Azizi M, Ghourchian H, Yazdian F et al. Anti-cancerous effect of albumin coated silver nanoparticles on MDA-MB 231 human breast cancer cell line // *Sci Rep.* 2017;7(1):5178. Published 2017 Jul 12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05461-3>

*A.V. Sherbanyuk<sup>1</sup>, S.I. Moiseev<sup>1</sup>, N.V. Bychkova<sup>1,2</sup>, N.A. Germanov<sup>3</sup>, S.N. Golyandin<sup>3</sup>, V.P. Ulin<sup>3</sup>, N.V. Ulin<sup>3</sup>, N.V. Kalmykova<sup>1</sup>*

### **Human myeloma RPMI8226 cells and normal cells have different sensitivity to bisilicate silver nanoparticles in vitro**

<sup>1</sup> The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St Petersburg

<sup>2</sup> Pavlov State Medical University, Ministry of health of Russia, St Petersburg

<sup>3</sup> Ioffe Institute, St Petersburg, Russia

**Introduction.** Silver nanoparticles due to its pronounced cytotoxicity are regarded as promising agent for anticancer therapy. Determination of normal and transformed cells sensitivity to silver nanoparticles can be the basis for the application as an adjuvant cancer treatment.

The objective of the study was to investigate influence of atomic clusters of Argentum (ACA) in the form of silver bisilicate nanoparticles colloid solution on viability and proliferation of human myeloma cell line, mesenchymal stromal cells and blood lymphocytes.

**Material and methods.** Cell viability was evaluated by MTT and LDH assay. Cell proliferation was evaluated by flow cytometry.

**Results.** It was found that ACA had dose-depending cytotoxicity toward all investigated cell types, but normal and transformed cells varied significantly in the sensitivity to nanoparticles. IC50 for myeloma cell line RPMI8226 was 1,75 µg/ml. For mesenchymal stromal cells (MSCs) of different origin IC50 was in the range of 12 to 16 µg/ml. ACA in concentration from 2 to 3 µg/ml induced RPMI8226 cells metabolic disruption and death without influence on viability and cell cycle of mesenchymal stromal cells and blood lymphocytes.

**Conclusion.** Results of work has shown distinct differences in sensitivity to ACA between myeloma cells, mesenchymal stromal cells and blood lymphocytes. The optimal range of ACA concentration with anticancer effect without cytotoxic influence on normal cells has been determined *in vitro*.

**Key words:** silver nanoparticles; cytotoxicity; proliferation; multiple myeloma

Поступила в редакцию 26.04.2021 г.