БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 4, с. 715–727

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.3

НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА – ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

© 2022 г. Д.Б. Корман*, Л.А. Островская*,#, Н.В. Блюхтерова*, В.А. Рыкова*, М.М. Фомина*

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

#E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 11.05.2022 г.
После доработки 11.05.2022 г.
Принята к публикации 13.05.2022 г.

В обзоре обобщены экспериментальные данные, связанные с изучением цитотоксической, противоопухолевой активности и механизма действия наночастиц серебра.

Ключевые слова: наночастицы серебра, цитотоксичность, противоопухолевая активность, клеточные культуры опухолей человека и животных.

DOI: 10.31857/S000630292204010X, **EDN:** ITWGBQ

Соединения, содержащие благородные металлы золото и серебро, на протяжении последних десятилетий широко исследуются в качестве веществ, обладающих разносторонней биологической активностью. Показана, в частности, на экспериментальных опухолевых моделях в условиях *in vitro* и *in vivo* способность такого рода соединений вызывать гибель опухолевых клеток, ингибировать развитие опухолей животных и ксенографтов опухолей человека, оказывать радиосенсибилизирующее действие [1–3].

Одним из направлений исследования веществ, содержащих золото и серебро, является изучение возможностей их применения для биомедицинских целей в виде наночастиц. Интенсивность развития этого направления исследований обусловлена уникальными физическими (размер, форма, поверхностный заряд) и химическими (элементный состав покрытия поверхности, растворимость) свойствами наночастиц золота и серебра, которые создают условия для развития в клетках живых организмов оксидативного стресса, ведущего к различным биологическим эффектам [1, 2, 4, 5].

Ранее нами были обобщены данные, характеризующие наночастицы золота в качестве цитотоксических и радиосенсибилизирующих агентов, имеющих определенную перспективу применения в виде потенциальных противоопухолевых средств [1].

Сокращения: НЧС – наночастицы серебра, АФК – активные формы кислорода.

Задача представленного обзора состоит в анализе результатов экспериментального изучения цитотоксической активности, противоопухолевых свойств и механизмов действия наночастиц серебра (НЧС).

Отметим, что препараты серебра, вследствие присущей данному металлу антимикробной активности, давно находят практическое применение в различных областях. Наночастицы серебра используются в медицинских целях (антисептические покрытия инструментов, катетеров), в парфюмерной и текстильной промышленности, при изготовлении антисептических спреев, предметов гигиены, при производстве контейнеров для хранения продуктов питания, некоторых предметов электроники [2, 6–9].

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Существует целый ряд физических и химических методов получения НЧС, в основе которых лежат реакции химического восстановления нитрата серебра с помощью аскорбиновой кислоты, этанола, гидрата бора, цитрата натрия и ряда других восстанавливающих агентов, а также процессы фотохимического, электрохимического восстановления, испарения, термального синтеза.

В последние годы серьезное развитие получил так называемый биогенный синтез («зеленый синтез») НЧС с использованием экстрактов разнообразных растений, водорослей, грибов, бактерий.

Принято считать, что биогенный синтез обладает рядом преимуществ по сравнению с химическими и физическими методами получения НЧС – не требуется применения токсических химических реагентов, сложного дорогостоящего оборудования, высоких температур и давления. Такие факторы как доступность, безопасность, простота и низкая стоимость биогенного синтеза способствовали его широкому распространению [9–12].

Методы биогенного получения НЧС могут быть разделены на экстрацеллюлярный и интрацеллюлярный синтез.

При экстрацеллюлярном биогенном синтезе в качестве восстанавливающих агентов обычно используются экстракты разных частей растений (листья, стебли, корни, плоды), служащие источником образующихся в них вторичных метаболитов (фенольные соединения, алкалоиды, изопреноиды, различные минорные соединения). В результате их действия ионы серебра восстанавливаются до атомов металлического серебра, которые формируют наночастицы разного размера, как правило, диаметром менее 100 нм. Варьируя условия протекания реакции – концентрацию соли, величину pH и температуру – можно контролировать размеры получаемых НЧС. Вторичные метаболиты, содержащиеся в экстрактах растений, покрывают образующиеся НЧС, имеющие, как правило, сферическую форму, что препятствует их агрегации. Такой процесс «естественного» покрытия наночастиц позволяет избежать этапа их специального покрытия, характерного для химического синтеза.

При интрацеллюлярном синтезе нитрат серебра добавляют к культуре микроорганизмов либо грибов, где происходит его внутриклеточное восстановление с образованием НЧС.

Среди НЧС, синтезированных биогенным путем, ~72% получены при использовании экстрактов растений и около 15% – при применении экстрактов грибов [8, 10, 12–15].

Биологическая активность НЧС, полученных при биогенном синтезе, подтверждена рядом экспериментальных данных.

Так, НЧС, полученные с использованием экстракта одного из видов малины (*Rubus fairholmianus),* покрытые слоем этого экстракта толщиной ~4.7 нм, индуцировали выраженную апоптотическую гибель клеток рака молочной железы человека линии MCF-7 (концентрация НЧС – 10 мкг/мл, время инкубации – 24 ч) [16].

Сферические НЧС со средним диаметром, равным 38.5 нм, полученные путем биогенного синтеза с участием актинобактерий линии B5, вызывали гибель клеток гепатокарциномы человека линии HepG2 (IC_{50} составил 8.4 мкг/мл) [17].

Показана преимущественная цитотоксическая активность НЧС, полученных биогенным путем, по сравнению с химически синтезированными частицами [18]. В цитируемом исследовании проведено сравнение НЧС, полученных биогенным путем с использованием экстракта листьев чая (НЧС-Ч) и синтезированных химическим способом с применением в качестве восстановителя цитрата натрия (НЧС-Ц).

«Биогенные» НЧС оказывали более значительное цитотоксическое действие как на опухолевые, так и на нормальные клетки по сравнению с химически синтезированными. При применении НЧС-Ч и НЧС-Ц индекс цитотоксичности IC_{50} для клеток рака легкого линии A549 составил 63.1 и 72.2 ppm, а для нормальных фибробластов мышей линии MRC-5 – 1.3 и 17.6 ppm соответственно. Для обоих типов НЧС характерно снижение цитотоксичности с возрастанием степени их агрегации.

Выявлены определенные различия также и в физико-химических характеристиках, сравниваемых наночастиц. НЧС-Ч и НЧС-Ц имели размеры, равные 8.3 и 10.1 нм, сферическую форму у 96 и 70% частиц, дзета-потенциал, составляющий 27.8 и 36.2 мВ соответственно.

Сравниваемые НЧС различались по характеру и размерам покрытия, а также по склонности к агрегации. «Биогенные» НЧС обладали биологической матрицей из элементов экстракта листьев чая и отличались меньшей склонностью к агрегации по сравнению с химически синтезированными [18].

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Изучению цитотоксичности НЧС для опухолевых клеток способствовало пристальное внимание к оценке токсичности соединений серебра, все более широко используемых в пищевой, медицинской, косметологической и парфюмерной промышленности. Во многих подобных токсикологических исследованиях экспериментальными моделями служили стабильные клеточные культуры опухолей человека различной природы. Очевидно, что полученные в этих исследованиях данные можно рассматривать и для оценки потенциальных противоопухолевых свойств НЧС.

Цитотоксичность НЧС исследована на широком спектре клеточных культур опухолей человека (рак молочной железы, шейки матки, легкого, предстательной железы, гепатоцеллюлярный, колоректальный, назофаренгиальный рак, глиобластома, фибросаркома). Показано, что НЧС вызывают гибель клеток практически всех изученных опухолей с индексом цитотоксичности IC_{50}, на-

ходящемся в диапазоне, соответствующем принятым критериям цитотоксичности химических соединений [19].

Например, при исследовании цитотоксичности сферических НЧС диаметром 7–20 нм IC_{50} для клеток фибросаркомы человека (линия HT-1080) составил 10.6 мкг/мл, а для клеток эпидермальной карциномы (A431) – 11.1 мкг/мл. Гибель клеток происходила в результате индукции оксидативного стресса – уровень глютатиона снизился в 1.6 и 3.0 раза, уровень супероксид дисмутазы – в 2.5 и в 2.0 раза, пероксидация липидов усилилась в 2.5 и 2.9 раза соответственно. Концентрация каспазы-3, требуемой для индукции апоптоза, составила 0.78 и 1.5 мкг/мл [20].

В то же время в ряде исследований не удалось зарегистрировать цитотоксический эффект у некоторых изученных НЧС. Так, при 24-часовом культивировании клеток MCF-7 с НЧС диаметром 20 нм в концентрации 0.39–100 мкг/мл не наблюдали гибель клеток, хотя при концентрации НЧС, равной 25 и 50 мкг/мл, регистрировали усиление продукции активных форм кислорода (АФК), но не наблюдали изменений потенциала митохондриальной мембраны. В то же время обнаружены индукция эпителиально-мезенхимального перехода по усилению экспрессии ряда белков, регулирующих эпителиально-мезенхимальный переход (MTA3, β-катенина), и усиление способности клеток к миграции [21].

Особый интерес представляют НЧС, получаемые биогенным синтезом с использованием экстрактов растений, обладающих собственной цитотоксической активностью. Предполагается, что при таком подходе можно добиться усиления противоопухолевого действия за счет суммации действия ионов серебра и этих растений, в том числе, за счет более значительного накопления в опухолевых клетках экстрактов растений, доставляемых НЧС [22].

Следует отметить, что антипролиферативная активность НЧС, полученных биогенным синтезом, изучена на разных линиях опухолевых клеток; при этом в большинство исследований включались клетки рака молочной железы, для которых НЧС оказались высокотоксичными [14].

Усиление цитотоксического действия экстрактов растений при использовании для их доставки в клетки НЧС показано в экспериментах по сравнительному изучению эффективности чистого экстракта листьев индийской конопли *(Fagonica indica*), обладающей значимой противоопухолевой активностью, и НЧС, полученных биогенным путем с применением этого экстракта.

Установлено, что как НЧС (диаметром 10–60 нм с дзета-потенциалом –16.3 мВ), покрытые экстрактом, так и «чистый» экстракт обладают существенной дозо- и время-зависимой цитотоксической активностью в отношении клеток MCF-7. Однако НЧС достоверно превосходили по цитотоксичности «чистый» экстракт – IC_{50} составлял 12.35 и 25.09 мкг/мл соответственно. Оба агента индуцировали в клетках продукцию АФК, усиливали активацию каспаз 3 и 9, вызывали апоптоз, при этом выраженность этих эффектов также была достоверно более значительной при применении НЧС [10].

Высокая дозозависимая цитотоксичность для клеток MCF-7 обнаружена у НЧС, полученных биогенным синтезом с использованием экстракта листьев черного чая, содержащего большие количества полифенолов, в том числе катехинов, обладающих противоопухолевой активностью. Инкубация клеток с этими НЧС приводила к почти 100%-й гибели клеток [23].

НЧС (средний размер 12 нм), полученные с использованием экстракта цветов одного из видов тысячелистника (*Achielea biebersteinii*), обладающего противоопухолевыми свойствами, вызывали дозо- и время-зависимую гибель клеток MCF-7 с индексом цитотоксичности IC_{50}, равным 20 мкг/мл (время инкубации – 24 ч) [24].

Сообщалось о получении НЧС биогенным синтезом с использованием экстракта зеленой шелухи грецкого ореха, содержащего большое количество полифенолов, в том числе эллаговую кислоту, обладающую противоопухолевой активностью. При инкубации клеток MCF-7 с этими НЧС зарегистрирована дозозависимая гибель клеток с максимальным эффектом (гибель 70% клеток) при концентрации НЧС, равной 60 мкг/мл. При применении в такой концентрации стандартных НЧС погибло 56% клеток, при применении экстракта – 40% клеток. Цитотоксичность «биогенных» НЧС в отношении фибробластов мышей линии L-929 была незначительной (гибель 15% клеток) [22].

Была исследована цитотоксичность НЧС, полученных в реакции нитрата серебра с водным экстрактом листьев крапивы индийской *(Acalypha indica)*, в отношении культуры клеток рака молочной железы MDA-MB-231 [25]. Зарегистрирована умеренная дозозависимая гибель клеток с максимумом гибели (40%) после 48-часовой инкубации при максимальной изученной дозе (100 мкг/мл). Такой же эффект зарегистрирован при инкубация этих клеток с такими же дозами нитрата серебра [25].

Более значительная цитотоксичность на клетках MCF-7 зарегистрирована для НЧС, полученных с использованием экстракта листьев центеллы азиатской *(Centella asiatica*). Культивирование клеток MCF-7 в течение 48 ч с этими НЧС в концентрации 100 мкг/мл привело к гибели 93% клеток. Однако при концентрации НЧС, равной 3 мкг/мл, гибель клеток составила всего 18.5%.

Определенное значение для эффективности НЧС имеет и длительность воздействия. При культивировании клеток с этими НЧС в течение 24 ч IC_{50} составил 8.8 мкг/мл, в течение 48 ч – 5.0 мкг/мл [26].

НЧС, полученные с использованием экстракта корневища растения семейства имбирных (*Kaempferia rotunda*), обладающего противоопухолевой активностью, вызывали дозозависимую гибель стволовых клеток глиобластомы человека – при концентрации НЧС, равной 40 мкг/мл, регистрировалась гибель 100% клеток, IC_{50} равнялся 6.8 мкг/мл [27].

Сферические НЧС (диаметром 3–36 нм с поверхностным зарядом –18.7 мВ), полученные при смешивании раствора нитрата серебра с автолизатом актинобактерий линии $SF_{23}M$, обладают цитотоксичностью как в отношении клеток рака молочной железы MCF-7, так и нормальных макрофагов линии RAW264.7. Индекс цитотоксичности IC_{50} составлял соответственно 12.9 и 16.3 мкг/мл [28].

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Существует представление, согласно которому НЧС следует рассматривать лишь как систему направленной доставки ионов серебра в высоких концентрациях к клеткам-мишеням. Предполагается, что, воздействуя на эту систему разными способами (варьируя размеры, природу связанных с ними лигандов, тип покрытия), можно существенно повысить эффективность действия НЧС за счет повышения интрацеллюлярного уровня ионов серебра [6, 9].

Показано, что цитотоксичность НЧС, так же, как и наночастиц других благородных металлов, зависит от их размера, характера поверхности, ее заряда, а также от концентрации и длительности воздействия [1, 9, 29].

Размер и форма наночастиц. Предполагается, что чем меньше размер наночастиц, тем выше их цитотоксичность вследствие усиления эндоцитоза. Однако в результате проведенных в этом направлении экспериментальных исследований НЧС получены неоднозначные данные.

При исследовании действия трех видов НЧС размерами 5, 20 и 50 нм, на четырех клеточных моделях разных опухолей человека (A549, SGC-7901, HepG2, MCF-7) установлено, что наиболее выраженные эффекты (гибель клеток, генерация АФК, развитие оксидативного стресса, блок клеточного цикла в S-фазе, индукция апоптоза) регистрировались при применении НЧС диаметром 5 нм. Наиболее значительное интрацеллюлярное содержание НЧС также наблюдалось при применении НЧС диаметром 5 нм, с чем и связывают наибольшую цитотоксичность НЧС такого размера [30].

Оценка влияния размера НЧС на их эффективность проведена на примере изучения цитотоксичности НЧС, полученных биогенным синтезом с использованием экстракта черного чая. Показано, что в отношении клеток линии MCF-7 НЧС диаметром 5 нм обладали существенно более высокой цитотоксичностью, чем НЧС диаметром 15 нм [23].

В сравнительном исследовании НЧС диаметром 20 и 110 нм, покрытых цитратом или поливинилпирролидоном, также обнаружена существенно более высокая цитотоксичность НЧС меньшего размера в отношении клеток легочного эпителия [31].

В другом исследовании показано, что самые малые (диаметром 4 нм) из изученных НЧС проявляли наибольшую эффективность (подавление роста клеток, развитие оксидативного стресса) в отношении клеток лейкоза U937 [29].

Однако в работе других авторов, проведенной на клетках HeLa и U397, показано, что размер изученных ими НЧС не влиял на их цитотоксичность [32]. При сравнении апоптотического эффекта НЧС диаметром 5 и 35 нм в отношении клеток остеосаркомы также было показано, что этот эффект не зависит от размера НЧС в случае одинаковой интернализации НЧС разного размера [9].

Необходимо отметить, что имеются данные, указывающие на способность НЧС в зависимости от размера оказывать либо цитотоксический эффект, либо вызывать стимуляцию пролиферации опухолевых клеток. При культивировании клеток гепатоцеллюлярного рака HepG2 с НЧС диаметром 20 нм регистрировалась дозозависимая цитотоксичность с повреждением ДНК и митохондрий, а также с развитием оксидативного стресса. В то же время применение НЧС диаметром 10 и 100 нм индуцировало пролиферацию клеток, активацию митоген-активируемой киназы (MAPK), повышение экспрессии c-Jun и c-Foc [29].

Сферические НЧС проявляют максимальную цитотоксичность по сравнению с НЧС другой формы, благодаря свойственному им оптимальному, наиболее высокому соотношению между площадью поверхности и объемом частицы.

Характер поверхности наночастиц. Цитотоксичность НЧС зависит от характера их поверхности. При этом полагают, что характер покрытия влияет на способность НЧС образовывать ионы серебра [31].

Было проведено сравнительное изучение действия химически синтезированных НЧС, покры-

тых цитратом (НЧС-Ц), с частицами, дополнительно модифицированными покрытием лактозой (НЧС-Ц-Л) или олигонуклеотидом (НЧС-Ц-О), на клетки рака легкого линии A549. Наиболее выраженная гибель клеток и гиперэкспрессия белка p53 зарегистрированы при действии исходных НЧС-Ц. В то же время НЧС-Ц-Л проявили более значительную цитотоксичность, чем НЧС-Ц-О. Отмечено, что модифицированные наночастицы (НЧС-Ц-Л и НЧС-Ц-О) вызывают меньшую гибель нормальных фибробластов кожи человека линии HDF, чем исходные наночастицы (НЧС-Ц). Обнаруженные различия связывают с разной степенью проникновения НЧС в клетки, зависящей от химических особенностей поверхности НЧС [33, 34].

Влияние характера покрытия на цитотоксичность НЧС подтверждается данными, полученными при сравнительном изучении активности НЧС диаметром 20 и 110 нм, покрытых цитратом или поливинилпирролидоном. Показана преимущественная цитотоксичность НЧС, покрытых цитратом, в отношении клеток рака легкого, вне зависимости от размера НЧС [31].

Заряд наночастиц. Влияние величины заряда на цитотоксичность НЧС было показано в сравнительном исследовании двух видов НЧС диаметром 30 и 50 нм, полученных путем восстановления дубильной кислотой (НЧС-Д) или боргидратом натрия (НЧС-Б), которые различались по величине дзета-потенциала (30.6 и 22.2 мВ соответственно) [35].

Цитотоксичность НЧС оценивали на клетках эпителия кожи человека (A-431), легочного эпителия человека (A-459) и на макрофагах мышей (RAW264.7) по маркерам оксидативного стресса – генерация АФК, гиперэкспрессия pp38, TNF-α, HSP-70. Показано, что цитотоксичность НЧС-Д была существенно выше цитотоксичности НЧС-Б.

Цитотоксичность НЧС-Д оказалась дозозависимой в диапазоне всех изученных концентраций, тогда как для НЧС-Б зависимость эффекта от дозы сохранялась в пределах концентраций, не превышающих 50 мкг/мл, при дальнейшем повышении концентрации цитотоксичность этого вида частиц уменьшалась.

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии показано, что при концентрации, равной 5 мкг/мл, оба типа НЧС не агрегируют, но при концентрации, равной 100 мкг/мл, агрегация наблюдалась только для НЧС-Б, тогда как НЧС-Д, имеющие более высокий дзета-потенциал, при этой концентрации не образовывали агломератов. С такими особенностями сравниваемых НЧС связывают их разную цитотоксичность, поскольку не агрегировавшие НЧС легче проникают в клетку, несмотря на отрицательный заряд поверхностной мембраны клеток [35].

Необходимо отметить, что НЧС при попадании в среду, содержащую белки, в частности, в кровь, подвергаются электростатическому взаимодействию с белками, что может приводить к образованию белковой «короны» (биомолекулярная корона) на поверхности НЧС. Образование такой белковой короны способно оказывать влияние на физические свойства НЧС, их абсорбцию, аккумуляцию, интрацеллюлярный эффект.

Показано, что НЧС с белковыми коронами могут попадать в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, а характер короны является важной предпосылкой для проявления высокой цитотоксичности НЧС [9, 11].

Тип опухолевых клеток. Зависимость цитотоксичности НЧС от типа опухолевых клеток показана в ряде исследований.

Так, было установлено, что цитотоксичность НЧС, диаметром 40 нм, примененных в концентрации 10 мкг/мл, снижалась в зависимости от вида опухолевых клеток в следующем ряду: A2780 (рак яичников) > MDA-MB-231 (трижды негативный рак молочной железы) > MCF-7 (эстрогензависимый рак молочной железы) [29].

В то же время цитотоксичность НЧС, полученных с использованием тропического растения семейства тыквенных *(Cucumis prophetarum)*, менялась в другой последовательности – MCF-7 (IC_{50} = 65.6 мкг/мл) > MDA-MB-231 (81.1 мкг/мл) > > HepG2 (94.2 мкг/мл) > A549 (105.8 мкг/мл). Как видно, к действию этих НЧС наиболее чувствительными оказались клетки рака молочной железы линии MCF-7 [36].

Культивирование трех разных линий клеток рака яичников человека со сферическими НЧС диаметром 25 нм, покрытыми поливинилпирролидоном, показало, что клетки двух линий (A2780 и SCOV3) высокочувствительны к цитотоксическому действию НЧС (IC_{50} составлял 7.2 и 9.4 мкг/мл соответственно), а клетки линии OVCAR3 оказались практически нечувствительными к их действию (IC_{50} равнялся 320.6 мкг/мл).

Показано, что клетки этих линий различались по базальному уровню АФК – он был высоким в клетках A2780 и SCOV3 и незначительным в клетках OVCAR3. Применение НЧС приводило к возрастанию уровня АФК в чувствительных клетках и не меняло его в нечувствительных клетках.

Следует отметить, что все три линии клеток рака яичников были одинаково чувствительными к цитотоксическому действию цисплатины (IC_{50} составлял 2.9, 5.3 и 4.6 мкМ соответственно) [37].

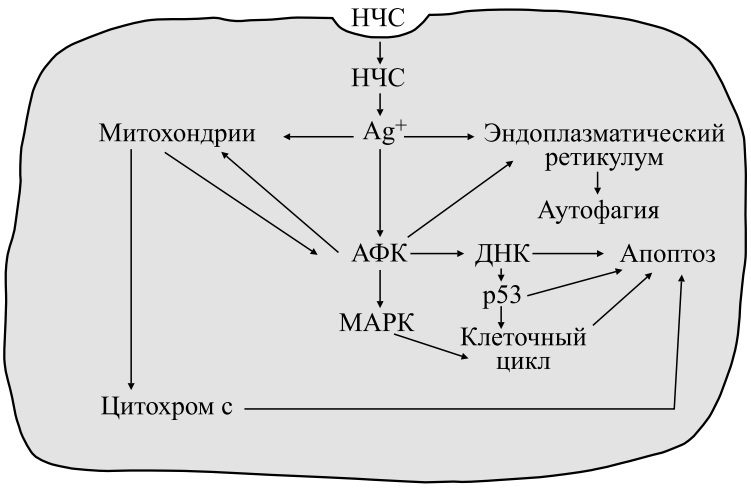

Рис. 1. Мишени и механизмы цитотоксического действия наночастиц серебра.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Цитотоксическое действие НЧС на опухолевые клетки может реализоваться путем апоптоза или некроза, индуцируемых разрушением ультраструктуры клеток в результате усиления продукции АФК, повреждения митохондрий, ДНК, инактивации ферментов и нарушения регуляторных сигнальных путей.

Предполагается, что НЧС способны блокировать инвазию опухолевых клеток и метастазирование путем ингибирования ангиогенеза.

Селективность попадания НЧС в опухолевые клетки может обеспечиваться эффектом «усиления проникновения и задержки», характерным для опухолей и обусловленным особенностями архитектуры ткани опухоли [7, 9, 11].

Реализация цитотоксического действия НЧС включает в себя несколько основных этапов:

– проникновение НЧС в клетку путем диффузии, фагоцитоза, простого эндоцитоза или рецептор-опосредованного эндоцитоза;

– интрацеллюлярная генерация АФК под действием самой НЧС или выделяемого из нее иона серебра, развитие оксидативногоо стресса;

– подавление разных антиапоптотических белков, экспрессия проапоптотических белков, активация сигнальных путей, регулирующих апоптоз [9, 29].

Результаты многочисленных исследований указывают на большое разнообразие мишеней и механизмов действия НЧС, которые могут участвовать в реализации их цитотоксичности [7, 9, 11, 29, 38].

Среди наиболее часто упоминаемых мишеней и механизмов действия отметим следующие:

– повреждение плазматической и митохондриальной мембран вследствие воздействия на мембранные белки, обусловленного высокой аффинностью серебра к сере, что приводит к увеличению пероксидации и проницаемости мембран, активации сигнальных путей;

– повреждение дыхательной цепи митохондрий, подавление продукции АТФ;

– усиление продукции АФК;

– снижение уровня глютатиона, подавление активности антиоксидантных ферментов;

– развитие оксидативного стресса;

– повреждение ДНК с нарушением экспрессии ключевых генов, регулирующих важные сигнальные пути, в частности *p53, p21*, *HIF-1, JNK*, *STAT-3, VEGF* и др.;

– экспрессия про- и антиапоптотических белков (Bax, BCL-2), что ведет к индукции апоптоза;

– выход из митохондрий в цитозоль цитохрома *c*, гиперэкспрессия каспаз 3, 8, 9;

– блок клеточного цикла;

– ингибирование теломеразы и дисфункция теломер;

– снижение активности металлопротеиназ MMP-2 и 9;

– повреждение эндоплазматического ретикулума, индукция автофагии.

Схематически мишени и механизмы действия НЧС показаны на рис. 1.

В первую очередь цитотоксичность НЧС связывают с увеличением продукции АФК и развитием оксидативного стресса. О важной роли гиперпродукции АФК в цитотоксическом действии НЧС свидетельствуют выявленные на клетках рака легкого A549 корреляции между уровнем АФК и степенью повреждения ДНК, митохондрий и

ранним апоптозом. Об этом же свидетельствует снижение цитотоксичности НЧС при предварительной обработке этих клеток антиоксидантом N-ацетилцистеином [39].

Следует заметить, что индукция в опухолевых клетках оксидативного стресса рассматривается в настоящее время как одно из новых перспективных направлений в лекарственной терапии рака [40].

Известно, что наночастицы серебра могут индуцировать двойные разрывы ДНК.

Культивирование опухолевых и нормальных клеток с НЧС (диаметром 23 нм), покрытыми поливинилпироллидоном, в дозе 10 и 25 мкг/мл приводило к достоверному увеличению уровня маркера двойных разрывов – гистона γH2AX, при этом эффект был наибольшим в клетках MDA-MB-231, меньшим – в клетках MCF-7 и еще меньшим – в нормальных клетках молочной железы линии MCF-10A [41].

Увеличение уровня гистона γH2AX зарегистрировано также после 24-часового культивирования с НЧС клеток рака яичников линий A2780 и SCOV3 (чувствительны к цитотоксическому действию) и не обнаружено в клетках рака яичников линии OVCAR3 (нечувствительны к действию наночастиц) [37].

О способности НЧС повреждать ДНК могут свидетельствовать и обнаруженные при действии НЧС (в концентрации 25 мкг/мл) хромосомные аберрации как в опухолевых (глиобластома человека U251), так и в нормальных (легочные фибробласты человека IMR-90) клетках. При этом частота аберраций в опухолевых клетках была существенно больше, чем в нормальных (0.32 и 0.18 на клетку соответственно). На этих клетках показано также, что НЧС подавляют клеточную пролиферацию, вызывая блок клеточного цикла в митозе, при этом в нормальных клетках происходит быстрое восстановление пролиферации, тогда как в опухолевых клетках подавление пролиферации регистрировалось в течение длительного времени [42].

Механизмы цитотоксического действия НЧС могут включать также нарушение интрацеллюлярного транзита Ca^{2+}, снижение экспрессии актинсвязывающего белка и филамина [42].

Важным условием реализации цитотоксического действия НЧС является их способность проникать внутрь клетки. Показано, что НЧС попадают как в нормальные (легочные фибробласты человека IMR-90), так и в опухолевые (глиобластома человека U251) клетки путем кларитин-опосредованного эндоцитоза и макропиноцитоза, а выводятся путем время-зависимого экзоцитоза. После попадания в клетку НЧС равномерно распределяются в цитоплазме и в ядре [42].

О роли эндоцитоза в реализации цитотоксического действия НЧС могут свидетельствовать результаты экспериментов, в которых показано, что предварительная обработка клеток рака молочной железы MBA-MB-231 цитохолазином Д (ингибитор большинства форм эндоцитоза) ингибирует цитотоксическое действие на эти клетки НЧС (диаметром 25 нм), покрытых поливинилпироллидоном [41].

Эти результаты были подтверждены в аналогичном эксперименте с клетками рака яичников линии A2780, чувствительными к цитотоксическому действию НЧС. Применение цитохолазина Д в опытах с клетками рака яичников линии OVCAR3, нечувствительными к действию НЧС, не оказало никакого эффекта [37].

Не исключается прямое попадание НЧС в клетку через ионные каналы [29].

Как уже отмечалось, дозозависимая гибель опухолевых клеток под влиянием НЧС может происходить путем как апоптоза, так и некроза.

Показано, в частности, что НЧС диаметром 18 нм, полученные в реакции с гидрохлорид гидроксиламином, вызывали преимущественно некротическую, а не апоптотическую гибель клеток MCF-7 (IC_{50} составил 40 мг/мл). При этом доля некротических клеток превосходит долю клеток в апоптозе при воздействии всех испытанных концентраций НЧС. Отмечено, что при возрастании концентрации НЧС количество апоптотических клеток практически не меняется, тогда как число некротических клеток постоянно [34].

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И НИТРАТА СЕРЕБРА

При исследовании механизмов цитотоксического действия НЧС возникает вопрос, чем обусловлен этот эффект – действием ионов серебра Ag(I), которые могут образовываться из НЧС, или особенностями действия НЧС как таковых. Результаты проведенных исследований весьма противоречивы [9, 29].

Ответ на этот вопрос пытаются найти в сравнительных экспериментах при одновременной оценке цитотоксичности НЧС и ионов серебра. При этом полагают, что в случае, если эффекты будут одинаковыми, то можно считать, что действие НЧС обусловлено ионами серебра, образующимися интрацеллюлярно из НЧС.

Считается, что механизмы цитотоксического действия НЧС в отношении опухолевых клеток могут быть близки механизмам действия на микробные клетки.

Исследования на бактериальных клетках показали, что биологическая активность НЧС обу-

словлена, в основном, действием катиона серебра, выделяющегося из НЧС.

Ион серебра связывается с тиоловыми группами ферментов, участвующими в дыхательной цепи бактериальной клетки, в результате чего генерируются АФК, что ведет к развитию оксидативного стресса и повреждению клетки. Показано, что ионы серебра генерируют также пероксиды, которые могут окислять липиды и повреждать клеточные мембраны [6, 34].

Методом катионного обмена установлено, что растворы НЧС содержат лишь незначительное количество свободных ионов серебра. Однако культивирование клеток рака печени человека с НЧС сопровождалось цитотоксичностью, сопоставимой с цитотоксичностью нитрата серебра, являющегося источником Ag(I). По мнению авторов исследования, это свидетельствует о роли интрацеллюлярного образования из НЧС ионов серебра в реализации цитотоксического действия НЧС [43].

Предполагается, что усилению этого эффекта при действии серебра в виде НЧС, по сравнению с применением серебросодержащих соединений, могут способствовать особенности поверхности НЧС, благодаря которым они способны более интенсивно генерировать АФК или катализировать окисление компонентов клетки [30, 34].

Однако при инкубации (в течение 24 ч) клеток линии HeLa53 с НЧС диаметром 5–10 нм или с нитратом серебра обнаружено, что цитотоксичность НЧС более чем в пять раз меньше цитотоксичности нитрата серебра. Индекс цитотоксичности IC_{50} составлял соответственно 92 и 17 мкг Ag/мл. Максимальное (близко к 100%) число клеток в апоптозе отмечено при концентрации НЧС, равной 120 мкг Ag/мл, и при концентрации нитрата серебра, равной 32 мкг Ag/мл. Исследование влияния этих агентов на стрессовые гены показало, что как НЧС, так и нитрат серебра индуцируют гиперэкспрессию генов mt-2A и ho-1 и не меняют экспрессию гена hsp70, но по степени влияния на экспрессию этих генов НЧС также уступали нитрату серебра [44].

В то же время при сравнении цитотоксичности для клеток HeLa нитрата серебра и сферических НЧС (средний диаметр 13.4 нм, дзета-потенциал – 61.9 мВ), полученных восстановлением нитрата серебра кверцетином, было обнаружено, что НЧС оказывают более выраженный цитотоксический эффект – значительное снижение выживаемости клеток начинается при концентрации НЧС, равной 2 мкг/мл, тогда как нитрат серебра при всех концентрациях незначительно снижал выживаемость клеток [32].

Однако на клетках гистиоцитарной лимфомы человека (линия U397) цитотоксичность этих НЧС и нитрата серебра оказалась очень близкой. Авторы интерпретируют эти результаты, как указание на зависимость участия ионов серебра в реализации цитотоксичности НЧС от типа опухолевых клеток, который может влиять на способность интрацеллюлярного выделения ионов серебра из НЧС [32].

Следует отметить, что в этих экспериментах клетки U397 оказались более чувствительны, чем клетки HeLa к цитотоксическому действию как НЧС, так и нитрата серебра – значительное снижение выживаемости клеток начиналось с концентрации 0.5 мкг/мл. Одним из объяснений этого факта, по мнению авторов, может быть различие в характере роста культур этих клеток. В отличие от культуры HeLa, которая является адгезионной культурой, культура клеток U397 относится к суспензионным культурам, что обеспечивает более значительный контакт клеток с НЧС и с ионами серебра [32].

Показано, что при кратковременном инкубировании (в течение 4 ч) НЧС и нитрат серебра вызывали практически одинаковую гибель клеток Т-клеточного лейкоза человека Jurkart. Уровень АФК в клетках также был одинаков. Однако при более длительной экспозиции (24 ч) применение НЧС приводило к генерации более высокого уровня АФК, активации сигнальных путей с участием p38-митоген активируемой протеин киназы, ядерных факторов E2 и κB-NF, что вело к повреждению ДНК, блоку клеточного цикла и апоптозу [45].

Изучалось влияние количества ионов серебра, содержащихся в НЧС, на выживаемость клеток рака легкого A549 [46]. Показано, что цитотоксичность суспензии НЧС зависит от уровня содержащегося в ней катиона серебра (Ag^+). При фракции Ag^+, составляющей 39%, выжило 92% клеток, при фракции 69% выживаемость клеток составила 54%. В то же время при сравнении цитотоксичности суспензии НЧС и ее супернатанта оказалось, что при содержании в них ионов серебра в количестве, равном 5.5% и более, цитотоксичность суспензии и супернатанта была одинаковой. Однако при уровне ионов серебра, равном 2.6% и менее, цитотоксичность суспензии превосходила цитотоксичность супернатанта. Авторы считают, что реализация цитотоксического действия наночастиц, как таковых, по сравнению с ионами серебра может происходить только при низком содержании последних [46].

При сравнении цитотоксичности нативных НЧС, полученных после фильтрации 30-суточного раствора НЧС, и фильтрата (предполагается, что в нем должны быть ионы серебра, выделившиеся в процессе хранения раствора НЧС) гибель клеток рака яичников (A2780) зарегистрирована только при применении нативных наночастиц [37].

В аналогичном эксперименте с клетками рака молочной железы MDA-MB-231 цитотоксичными оказались также только НЧС, но не фильтрат [41]. Возможно, это обусловлено слишком низким содержанием ионов серебра Ag^+ в фильтрате, которое в этих экспериментах количественно не оценивалось.

Не выявлено различий в цитотоксичности НЧС и нитрата серебра на клетках рака молочной железы MCF-7 [25].

Цитотоксичность НЧС и нитрата серебра оказалась одинаковой для клеток рака яичников линии A2780, чувствительных к действию НЧС. Однако клетки рака яичников линии OVCAR3, нечувствительные к цитостатическому НЧС, проявили весьма значительную чувствительность к нитрату серебра [37].

Обнаружено, что НЧС (диаметром 5 нм) и нитрат серебра, примененные в одинаковых концентрациях (1.00–1.75 мкг/мл), обладают равной генотоксичностью и цитотоксичностью, определяемыми с помощью микроядерного теста и измерения уровня оксидативного стресса, в отношении лимфобластов селезенки человека линии TK6.

Однако добавление в культуру клеток N-ацетилцистеина (хелатор Ag^+) снижало генотоксичность нитрата серебра и не влияло на эффект наночастиц серебра, тогда как добавление перехватчика радикалов (тролокса) уменьшало генотоксичность обоих агентов.

Установлено, что в культуральной среде, содержащей НЧС, ионизируется только 0.5% наночастиц. Показано, что такая концентрация Ag(I) не оказывает на клетки цитотоксического и генотоксического действия. С помощью ЭПР анализа показано, что гидроксильные радикалы прямо продуцируются только НЧС. Авторы исследования приходят к выводу, что цитотоксическое действие НЧС не связано с образованием ионов серебра [47].

ФОТО- И РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Согласно представлениям о физических механизмах биологического действия наночастиц, можно полагать, что НЧС, аналогично наночастицам золота, также могут обладать фото- и радиосенсибилизирующими свойствами. Обнаружение таких свойств у наночастиц благородных металлов позволяет рассчитывать на потенциальную возможность их использования при фотодинамической и лучевой терапии опухолей [48].

Фотосенсибилизирующее действие обнаружено у НЧС, диаметром 98.5 нм, полученных биогенным синтезом с использованием экстрактов листьев артишока *(Cynara Scolymus*). Показано, что сочетанное применение этих НЧС и облучения красным светом приводит к существенному дозозависимому снижению выживаемости клеток MCF-7 по сравнению с использованием только НЧС. Обнаружено, что в результате такой сочетанной терапии значительно (более чем в четыре раза) увеличивается внутриклеточное содержание АФК, достоверно снижается уровень антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глютатионпероксидаза), резко увеличивается соотношение про- и антиапоптотических белков (Bax/Bcl-2) и значительно возрастает активность каспазы-3 по сравнению с действием только НЧС. Следует заметить, что в этих экспериментах при применении только НЧС регистрировались те же эффекты, но они были менее выраженными, чем при сочетанном воздействии обоих факторов [49].

В ряде экспериментальных исследований был показан радиосенсибилизирующий эффект НЧС.

Культивирование в течение 24 ч клеток рака молочной железы (MDA-MB-231; MCF-7) и нормальных эпителиальных клеток молочной железы (MCF-10A) с НЧС диаметром 25 нм, покрытыми поливинилпирролидоном, в концентрациях 10–25 мкг/мл, с последующим рентгеновским облучением в дозе 4 Гр достоверно увеличивало во всех клетках повреждение ДНК (через 1 ч после облучения) по сравнению с эффектом только облучения (оценено по уровню маркеров двойных разрывов ДНК – гистону γH2AX).

Наиболее чувствительными к комплексному воздействию НЧС и облучения оказались клетки MDA-MB-231. С помощью клоногенного теста показано, что применение НЧС в дозе 1 мкг/мл в сочетании с облучением (2 Гр) усиливает эффект облучения в два раза, а применение НЧС в более высоких концентрациях (5 и 10 мкг/мл) при облучении приводит к полному ингибированию образования клеточных колоний [41].

На клетках гепатокарциномы HepG2 индекс усиления цитотоксичности при комбинации НЧС с облучением (6 Гр) составил величину, равную 1.98 [51].

Наряду с этим имеются данные, свидетельствующие об отсутствии радиосенсибилизирующих свойств НЧС.

Так на ксенографтах рака молочной железы MDA-MB-231 было показано, что внутриопухолевое введение мышам НЧС не приводило к усилению действия облучения (4 Гр, дважды с интервалом в 21 сутки) [41].

Важно отметить, что к НЧС проявляют чувствительность клетки, находящиеся в состоянии гипоксии. Так, показано, что индекс цитотоксичности IC_{50} НЧС составил для клеток глиомы U251

в условиях гипоксии (1% O_2) 30.3 мкг/мл, а в условиях нормоксии – 34.7 мкг/мл. Для клеток глиомы С6 этот показатель равнялся 27.5 и 32.5 мкг/мл соответственно [51].

Предполагается, что НЧС могут повышать чувствительность гипоксических опухолевых клеток к лучевой терапии.

При сочетанном воздействии НЧС (диаметром 27 нм, получены электрохимическим методом) и облучения (линейный ускоритель) на клетки глиомы U251 и глиомы С6, культивируемые в условиях гипоксии (1% O_2), индекс радиосенсибилизации составил 1.78 и 1.84 соответственно. При этом для клеток, культивируемых в условиях нормоксии, индекс радиосенсибилизации имел значения, равные 1.34 и 1.45 соответственно.

Радиосенсибилизирующий эффект НЧС связывают с более значительным их накоплением в гипоксических клетках по сравнению с другими опухолевыми клетками в популяции [51].

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Определенная противоопухолевая активность некоторых НЧС показана в ряде исследований, выполненных на экспериментальных моделях опухолей животных и ксенографтах опухолей человека в условиях *in vivo*.

В этих экспериментах использовали как перевиваемые (меланома B-16, рак молочной железы 4T1, глиома С6, опухоль Эрлиха), так и канцероген-индуцированные (индуцированная диэтилнитрозоамином гепатокарцинома, индуцированная метилхолантреном фибросаркома) опухоли мышей, а также ксенографты опухолей человека (рак молочной железы MDA-MB-231, рак предстательной железы PC-3) [9].

Определенная чувствительность опухолей в условиях *in vivo* к НЧС (диаметром 25 нм, покрытие поливинилпирролидоном) продемонстрирована в экспериментах с ксенографтами рака молочной железы человека MDA-MB-231. Зарегистрирована выживаемость всех подопытных мышей на протяжении 100 суток при внутривенном введении НЧС в дозе 6 мг Ag/кг трижды в неделю в течение 10 недель. Выживаемость контрольных мышей к этому сроку составила 30% [52].

Показано, что НЧС, полученные с использованием экстракта корневища растения из семейства имбирных (обладает противоопухолевой активностью), вызывали при применении в дозе 12 мг/кг/сутки на протяжении пяти суток торможение развития асцитной опухоли Эрлиха на 55% по сравнению с контролем.

В то же время НЧС, полученные с использованием экстракта фруктов тропического фруктового растения *Zizyphus mauritiana* (противоопухолевой активности не имеет), при применении в дозе 12 мг/кг/сутки тормозили рост опухоли Эрлиха всего на 20%, а при применении в дозе 6 мг/кг/сутки оказались полностью неэффективны [53].

Одним из направлений доклинического изучения новых потенциальных противоопухолевых агентов является изучение их цитотоксичности в отношении опухолевых клеток, резистентных к стандартным противоопухолевым препаратам. Предполагается, что применение НЧС может подавлять некоторые механизмы развития множественной лекарственной устойчивости раковых клеток, такие как повышение толерантности к оксидативному стрессу, усиление репарации ДНК, активация Р-гликопротеина Pgp, обеспечивающего выброс препаратов из клетки.

На клетках рака толстой кишки Colo320 с гиперэкспрессией Pgp, резистентных к химиотерапии, показано, что комбинация НЧС с разными противоопухолевыми препаратами (метотрексат, цисплатин, кармустин, блеомицин, винбластин, вепарамил) привела к синергетическому усилению цитотоксичности всех изученных противоопухолевых препаратов. Это дало основание считать, что преодоление множественной лекарственной устойчивости с помощью наночастиц обусловлено подавлением активности Pgp, ведущим к повышению интрацеллюлярной концентрации препаратов [9].

Однако на клетках рака молочной железы, резистентных к тамоксифену (MCF-7/TAMR-1), цитотоксичность сферических НЧС, диаметром 5–30 нм, полученных с использованием экстракта листьев Гарцинии атровидис *(Garcinia atroviridic*), оказалась значительно меньше эффекта тамоксифена (IC_{50} равнялся 32.0 и 11.5 мкг/мл соответственно). В то же время на клетках рака молочной железы (MCF-7), чувствительных к тамоксифену, эти НЧС оказались более эффективными, чем тамоксифен. Индекс цитотоксичности IC_{50} в отношении этих клеток составлял для НЧС и тамоксифена 2.0 м и 8.8 мкг/мл соответственно (время инкубации – 72 ч) [12].

Одним из путей применения НЧС в лекарственном лечении опухолей может быть включение их в разные схемы комбинированной терапии. В этом отношении несомненный интерес представляют результаты исследования цитотоксичности совместного применения НЧС и цисплатины, проведенного на трех разных линиях рака яичников человека.

Показано, что для клеток двух линий (A2780 и OVCAR3) эффект комбинации оказался синергетическим по сравнению с применением каждого

препарата в отдельности, а на клетках линии SCOV3 зарегистрирован лишь небольшой аддитивный эффект [37]. Вероятно, эффективность этой комбинации не связана с чувствительностью клеток к действию НЧС – клетки A2789 и SCOV3 чувствительны к НЧС, тогда как клетки OVCR3 – нечувствительны. Следует также отметить, что клетки всех трех линий одинаково чувствительны к цитотоксическому действию цисплатины.

Синергетическое усиление цитотоксичности показано на клетках рака яичников человека линии A2780 при комбинации НЧС с антимикробным препаратом салиномицином, обладающим противоопухолевой активностью [54].

На клетках HeLa зарегистрировано усиление гибели клеток рака шейки матки при сочетании НЧС с камптотецином (ингибитор топоизомеразы) [55], трихостатином (ингибитор гистондеацетилазы) [56]. Эффективность сочетания НЧС с еще одним ингибитором гистондеацетилазы MS-275 показана на клетках рака легкого A549 [57].

Показана определенная способность наночастиц серебра оказывать антиканцерогенное действие.

Пероральное введение крысам НЧС, полученных биогенным синтезом с использованием актинобактерий B5, в дозах 25–50 мг/кг дважды в неделю в течение 21 недели одновременно с канцерогеном диэтилнитрозоамином, привело к достоверному подавлению частоты возникновения гепатокарцином. Число развившихся опухолей при применении НЧС в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг составило $4.0 \pm 0.4\%$ и $3.0 \pm 0.4\%$ соответственно, при развитии 5.0 ± 1.0 опухолей в контроле. Зарегистрировано также достоверное снижение средней массы опухоли – с 0.56 г в контроле до 0.2–0.18 г при применении НЧС [17].

Клинические испытания противоопухолевых свойств НЧС, по-видимому, пока не проводились.

Было опубликовано одно сообщение о случае успешного применения НЧС у больного 78 лет с метастазами плоскоклеточного рака полости рта в легкие и печень, резистентными к терапии цисплатиной и таксанами. После лечения пероральным приемом раствора НЧС диаметром 3 и 12 нм рентгенологически зарегистрирована полная регрессия метастазов длительностью 18+ месяцев. Показано, что содержание Ag^+ в крови через 1 ч после приема 60 мл раствора НЧС возросло с 32 до 46 нг/г; в моче ионы Ag^+ не были обнаружены [58].

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ОТНОШЕНИИ НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

В связи с достаточно широким использованием НЧС при изготовлении предметов бытового и медицинского назначения были проведены исследования по безопасности их применения и, в частности, по изучению токсичности НЧС для нормальных клеток и органов.

В ряде исследований показано, что НЧС способны оказывать цитотоксическое действие на некоторые нормальные клетки.

Так, установлено, что НЧС диаметром 15, 30 и 55 нм вызывали дозозависимое снижение выживаемости альвеолярных макрофагов при инкубации в течение 24 ч. При этом зарегистрировано десятикратное увеличение внутриклеточного уровня АФК после применения НЧС диаметром 15 нм в концентрации 50 мкМ [4].

На нормальных клетках печени крыс (BRL 3A) показано, что НЧС диаметром 15 и 100 нм, примененные в концентрациях 5–50 мкг/мл, при инкубации в течение 24 ч вызывали гибель клеток в результате развития оксидативного стресса (увеличение генерации АФК, снижение уровня глютатиона и потенциала мембран митохондрий) [59].

Применение НЧС в опытах с фибробластами линии NIH_3T_3 индуцировало в этих клетках выход цитохрома *c* в цитозоль и транслокацию проапоптотических белков Bax в митохондрии. Показано также, что индукция в фибробластах апоптоза в результате действия НЧС ассоциирована с активацией JNK-киназы [38].

Цитотоксичность НЧС диаметром 5–10 нм, полученных в импульсно-плазменном реакторе, показана в отношении стволовых герминативных клеток мышей линии C18-4. Инкубация клеток с этими НЧС приводила к выраженной гибели клеток с показателем IC_{50}, равным 8.75 мкг/мл [60].

В то же время в ряде исследований не зарегистрирована цитотоксичность НЧС для нормальных клеток.

Культивирование мышиных гепатоцитов линии AML_{12} в течение 24 ч с НЧС диаметром 15 и 6 нм (в концентрации 5 и 10 мкг/мл) сопровождается лишь незначительной цитотоксичностью для клеток (гибель 10–30% клеток). Не обнаружено появление серебра в митохондриях и не зарегистрированы нарушения дыхательной функции митохондрий [61].

Наночастицы серебра диаметром 25 нм, покрытые поливинилпирролидоном, не оказывали существенного влияния на нормальные эпителиальные клетки молочной железы линии MCF-10A (IC_{50} = 83.3 мкг/мл), будучи высокотоксич-

ными для клеток рака молочной железы линии MDA-MB-231 (IC_{50} = 11.9 мкг/мл) [52].

Местное применение на инфицированную рану крыс НЧС, полученных с помощью биогенного синтеза с применением экстракта стебля и корней растения *Acacia rigidula*, растущего в северо-восточных регионах Мексики, не сопровождалось какими-либо функциональными изменениями со стороны печени и почек [62].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ накопленной информации о цитотоксических свойствах НЧС и механизме их действия позволяет рассматривать эти субстанции в качестве возможной основы для разработки потенциальных лекарственных противоопухолевых средств. Большинство исследователей, работающих в этом направлении, считает, что наиболее перспективными могут быть экспериментальные доклинические исследования противоопухолевой активности НЧС, полученных биогенным путем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, Л. А. Островская, Н. В. Блюхтерова и др., Биофизика, **66** (6), 1229 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106020X
2. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., Биофизика, **66** (5), 978 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
3. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, Вопр. онкологии, **64** (6), (697 (2018)
4. C. Carlson, S. M. Hussain, A. M. Schrand, et al. J. Phys. Chem. B, **112**, 13608 (2008). DOI: 10.1021/j/p712087m
5. W. Yang, H. Veroniania, X. Qi, et al., Adv. Ther. (Weint), **3** (1), 201900102 (2020). DOI: 10.1002/adtp.201900102
6. J. Liu, D. A. Sonshine, S. Shervani, and P. H. Hurt, AcsNano, **4** (11), 6903 (2010). DOI: 10.1021/nn102272n
7. S. Dasari, C. Yedjon, R. T. Brodell, et al., Nanotechnol. Rew., **9** (1), 1500 (2020). DOI: 10.1515/intrev-2020-0117
8. M. Rai, A. P. Ingle, J. Trzcinska-Wencel, et al., Nanomaterials, **11**, 2901 (2021). DOI: 10.3390/nanj11112901
9. D. Kovacs, N. Igaz, M. K. Gopisetty, and M. Kiricsi, Int. J. Mol. Sci., **23**, 839 (2022). DOI: 10.3390/ijms230020839
10. I. Ullah, A. T. Khalie, M. Ali, et al., Oxidative Med. and Cell. Longevity, **2020**, ID1215395 (2020). DOI: 10.1155/2020/1215395
11. L. Xu, Y. Y. Wang, J. Huang, et al., Theranostics, **10** (20), 8996 (2020). DOI: 10.7150/Thno.45413
12. N. I. Zulklifli, M. Muhamad, M. N. Zain, et al., Molecules, **25**, 4432 (2020). DOI: 10.3390/molecules25184332
13. C. E. Escrcega-Gonzalez, J. A. Garza-Cervantes, A. Vazquez-Rodiguez, et al., Int. J. Nanomedicine, **13**, 2349 (2018). DOI: 10.2147/ijn.s160605
14. H. Barabadi, M. A. Mahjoub, B. Tajani, et al., J. Cluster Sci., **30**, 259 (2019). DOI: 10.1007/s10876-018-014917
15. O. Erdogan, M. Abbak, G. M. Demitbolat, et al., PLoS One, **14** (6), e0216496 (2019). DOI: 10.1371/journale.pone.0216496
16. B. P. Georg, N. Kumar, H. Abrahams, and S. S. Ray, Sci. Rep., **8**, 14368 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-32480-5
17. T. Shanmugasundaram, M. Radhakrishnan, V. Gopikrishnan, et al., Nanoseale, **9**, 16773 (2017). DOI: 10.1039/c7nr04979
18. P. Belteky, A. Rohavari, N. Igaz, et al., Int. J. Nanomed., **14**, 667 (2019). DOI: 10/2147/IJNN.s185965
19. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в сб. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, с. 642.
20. S. Arora, J. Jain, J. M. Rajwade, and K. M. Paknikar, Toxicol. Lett., **179** (2), 93 (2008). DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.04.009
21. M. Rakowski, S. Porebski, A. Grzelak, Int. J. Mol. Sci., **22** (9), 9203 (2021). DOI: 10.3390/ijms22179203
22. S. Khorrami, A. Zarrabi, M. Khaleghi, et al., Int. J. Nanomedicine, **13**, 8013 (2018). DOI: 10.2147/IJN.s189295
23. S. Rajawat, R. Kurchania, K. Rajukumar, et al., Green Process Synth., **5**, 173 (2016). DOI: 10.1515/gps-2015-0104
24. J. Baharara, F. Namvar, I. Ramerzani, et al., Molecules, **20** (3), 2693 (2015). DOI.org/10.3390/molecules20022693
25. C. Krishnaraj, P. Muthukumaran, R. Ramachandran, et al., Biotechnol. Rep., **4**, 42 (2014). DOI: 10/1016/j.btre.2914.08.002
26. S. E. Fard, F. Tafvizr, and M. B. Tozbati, IET-Nanobiotechnol., **12** (7), 994 (2018). DOI: 10.1049/iet-nbt.2018.5069
27. S. R. Kabir, Z. Dai, M. Nurujjaman, et al., J. Cell Mol. Med., **24**, 13223 (2020). DOI: 10.1111/jcmm15934
28. M. Wypij, T. Jedrzemnewski, J. Trzcinska-Wencel, et al., Front. Microbiol., **12**, 632505 (2021). DOI: 10.3389/fmicb.2021.632505
29. M. Acter, M. T. Sikder, M. M. Rahman, et al., J. Adv. Res. **9** (1), 1 (2018). DOI: 10.1016/j.jare.2017.10.008
30. W. Liu, Y. Wu, C. Wang, et al., Nanotoxicology, **4** (3), 319 (2010). DOI: 10.3109/117435390.2020.483745

31. X. Wang, Z. Ji, C. H. Chang, et al., Small, **10** (2), 385 (2014). DOI: 10.1002/small.201301597

32. S. I. Kaba and E. M. Egorova, Nanotechnol. Sci. Appl., **8**, 19 (2015). DOI: 10.2147/NSA.5578134

33. I. Sur, M. Altunbak, H. Kahraman, and M. Culha, Nanotechnology, **23** (37), 375 (2012). DOI: 10.1088/0957-4484/23/37/372102

34. H. Ciftci, M. Turk, U. Tamer, et al., Turkish J. Biol., **37**, 573 (2013). DOI: 10.3906/biu-1302-21

35. J. Kaur and K. Tikoo, Food Chem.Toxicol., **51**, 1 (2013). DOI: 10.106/j.fct.2012.08.044

36. Hemlata, P. R. Meena, A. P. Singh, and K. K. Tejavcath. Acs Omega, **5**, 5520 (2020). DOI: 10.1021/acsomega.0c00155

37. C. D. Fahrenholtz, J. Swanner, M. Ramirez-Prez, and R. N. Singh, J. Nanomaterials, **2017**, ID5107485 (2017). DOI: 10.1155/2017/5107485

38. Y. H. Hsin, C. F. Chen, S. Huang, et al., Toxicol. Lett., **179** (3), 130 (2008). DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.04.015

39. R. Foldbjerg, D. A. Dang, and H. Autrup, Arch. Toxicol., **85** (7), 743 (2011). DOI: 10.1007/S00204-010-0545-5.

40. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, Биофизика, **64** (3), 552 (2019). DOI: 10.1134/S000302919030165

41. J. Swanner, J. Mims, D. Carell, et al., Int. J. Nanomed., **10**, 3937 (2015). DOI: 10.2147/IJN.S80349

42. P. V. AshaRani, M. P. Hnde, and S. Valiyaveettie, BMC Cell Biol., **10**, 65 (2009).

43. S. Kim, J. E. Choi, J. Choi, et al., Toxicol. in vitro, **33** (6), 1076 (2009). DOI: 10.1016/j.tiv.2009.06.001

44. N. Miura and Y. Shinohara, Biochem. Biophys. Res. Comm., **390** (3), 733 (2009). DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.10.039

45. H. J. Eom and J. Choi, Environ. Sci. Technol., **44** (21), 8337 (2010). DOI: 10.1021/es1020668

46. S. Beer, R. Fuldbjerg, Y. Hayashi et al. Toxicol. Lett. **208** (3) 286 (2012). DOI: 10.1016/j/tox.let.2011.11.002

47. Y. Li, T. Qin, T. Ingle, et al., Arch. Toxicol., **91** (1), 509 (2017). DOI: 10.1007/s00204-016-1730-y

48. D. B. Korman, L. A. Ostrovskaya, N. V. Bluhterova, et al., Biophysics, **66** (6), 1046 (2021). DOI: 10.1134/s0006350921060063

49. O. Erdogan, M. Abbak, G. M. Demirbolat, et al., PLoS One, **14** (6), eo216496 (2019). DOI: 10.1371/journale.pone.0216496

50. Q. Zheng, H. Yang, J. Wei, et al., Biomed. Pharmacother., **67** (7), 569 (2013). DOI: 10.1016/j.biopha.2013.04.003

51. Z. Liu, H. Tam, X. Zhang, et al., Artif. Cells Nanomed. Biothechnol., **46** (s3), 922 (2018). DOI: 10/1080/21691401.2018.1518912

52. J. Swanner, C. D. Fahrenholtz, I. Tenvooren, et al., FASEB BioAdvances, **1**, 639 (2019). DOI: 10.1096/fba.2019-00021

53. S. R. Kabir, A. K. Asaduzzanan, R. Amin, et al., Acs Omega, **5**, 20599 (2020). DOI: 10.1021/acsokmega.0c02878

54. X. F. Zhang and S. Gurunathan, Int. J. Nanomedicione, **11**, 3655 (2016). DOI: 10.2147/IJN,S111279

55. Y. Yuan, S. Zhang, J. Hwang, and I. K. Kong, Oxid. Med. Cell Longev., **2018**, 5121328 (2018). DOI: 10.1155/2018/6121328

56. N. Igaz, D. Kovasc, Z. Razga, et al., Coloids Surf. B Biointerfaces, **146**, 670 (2016). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.07.004

57. S. Guranathan, M. Kang, and J. Kim, Molecules, **23** (2), 2046 (2018). DOI: 10.3390/molecules23082046

58. J. Singh, W. Moore, F. Fattah, et al., Head Neck, **41** (1), E11 (2019). DOI: 10.1002/hed.25492

59. S. M. Hussain, K. L. Hess, J. M. Gearhart, et al., Toxicol. in vitro, **19** (7), 975 (2005). DOI: 10.1016/j.tiv.2005.06.034

60. L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. J. Schlager, et al., Toxicol. Sci., **88** (2), 412 (2005). DOI: 10.1093/toxsci/kfi256

61. L. Wang, D. F. Mello, R. M. Zucker, et al., Envoron. Sci. Technol., **55** (16), 111 (2021). DOI: 10.1021/asc.ets.1c02295

62. C. E. Escrcega-Gonzeler, J. A. Garza-Cervantes, A. Vazquez-Rodiguez, et al., Int. J. Nanomedicine, **13**, 2349 (2018). DOI: 10.2147/IJN.S160605

Silver Nanoparticles – Cytotoxic Activity and Mechanism of Action

D.B. Korman*, L.A. Ostrovskaya*, N.V. Bluhterova*, V.A. Rikova*, and M.M. Fomina*

**Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

The review presents experimental data obtained in the study of the cytotoxic and antitumor activity, and the mechanism of action of silver nanoparticles.

Keywords: silver nanoparticles, cytotoxicity, antitumor activity, cell cultures of human and animal tumors