

КРЕМНИЕВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК УСИЛИТЕЛИ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ДЛЯ СОНОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Л.А.Осминкина*, А.А.Кудрявцев**, С.В.Зиновьев***, А.П.Свиридов*,
Ю.В.Каргина*, К.П.Тамаров*, В.Н.Никифоров*, А.В.Иванов***,
А.Н.Васильев****, В.Ю.Тимошенко*

*Физический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ; **Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., РФ; ***РОИЦ им. Н.Н.Блохина, Москва, РФ; ****Уральский федеральный университет, Екатеринбург, РФ

Исследована возможность использования наночастиц мезопористого кремния как усилителя (сенсibilизатора) воздействия терапевтического ультразвукового излучения в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что сочетанное воздействие наночастиц и ультразвука приводит к значительному подавлению темпа пролиферации раковых клеток Нер-2 и ингибированию роста карциномы легкого Льюис у мышей. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности кремниевых наночастиц в качестве сенсibilизаторов для сонодинамической терапии опухолей.

Ключевые слова: ультразвук, наночастицы, опухоль, сонодинамическая терапия

Известно, что в сонодинамической терапии (СДТ), являющейся наряду с фотодинамической терапией (ФДТ) одним из современных подходов к лечению злокачественных новообразований, используется ультразвуковое излучение (УЗИ) относительно низкой интенсивности, действие которого локально усиливается с помощью специальных веществ — соносенсibilизаторов [4,11]. В качестве соносенсibilизаторов обычно используют сложные органические соединения или твердотельные наночастицы [2]. Преимущество СДТ перед ФДТ заключается в том, что в отличие от света ультразвук может проникать глубоко в ткани, а также может одновременно использоваться для диагностики новообразований [2,4,5,11]. При применении наночастиц-соносенсibilизаторов терапевтическое действие УЗИ обусловлено возникающими тепловыми (гипертермия), акустическими (кавитация) и сонохимичес-

кими (генерация активных радикалов) эффектами в местах локализации нанообъектов [2,10]. Среди различных наносенсibilизаторов особо можно выделить кремниевые наночастицы (SiNPs), отличающиеся не только низкой токсичностью [1], но и биodeградируемостью [6]. В работах [3,8] было показано, что SiNPs могут выступать в качестве сенсibilизаторов УЗИ. При этом сочетанное действие SiNPs и УЗИ (27 кГц) может приводить *in vitro* практически к полному разрушению клеток при интенсивности УЗИ около 2 Вт/см² или к щадящей гибели клеток по механизму апоптоза при уменьшении интенсивности УЗИ примерно на порядок [3]. В работе [9] продемонстрировано значительное торможение роста опухоли (меланомы В16) при воздействии УЗИ (частота 1-3 МГц, интенсивность 1-2 Вт/см²) и внутривенном введении покрытых биосовместимым полимером (декстраном) SiNPs. В то же время для выяснения всех возможностей использования кремниевых наночастиц-соносенсibilизаторов в СДТ необходимы детальные исследования на различных моделях.

Адрес для корреспонденции: osminkina@mig.phys.msu.ru.
Осминкина Л.А.

Цель данной работы — исследовать влияние сочетанного действия SiNPs и УЗИ с терапевтическими значениями мощности и интенсивности на пролиферацию раковых клеток *in vitro*, а также на рост злокачественной опухоли *in vivo*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Водные суспензии SiNPs получены в результате механического измельчения пленок мезопористого кремния в планетарной мельнице FRITSCH “Pulverisette 7” в течение 30 мин по методу [8]. Пленки мезопористого кремния формировались с помощью стандартного метода электрохимического травления пластин кристаллического кремния (с-Si) p-типа проводимости с ориентацией поверхности (100) и удельным сопротивлением 1-5 мОм·см в растворе плавиковой кислоты и этанола (HF(50%):C₂H₅OH=1:1) при плотности тока травления 60 мА/см² в течение 1 ч. Структура и поверхностное покрытие образцов исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) LEO-912 AB OMEGA и инфракрасного фурье-спектрометра Bruker IFS 66v/S. Согласно данным ПЭМ, средний размер получаемых SiNPs составлял 50 нм, при этом наночастицы имели пористую структуру со средним размером пор и нанокристаллов кремния около 5 нм. Установлено, что поверхность SiNPs преимущественно покрыта оксидом кремния, о чем свидетельствовало присутствие Si-O-Si связей в спектрах поглощения инфракрасного излучения в тонких слоях высушенных образцов SiNPs.

В экспериментах *in vitro* использовалась культура клеток Нер-2 (положительная опухоль гортани человека). Для оценки цитотоксичности SiNPs их концентрированные водные суспензии (~20 мг/мл)

разводили в солевом растворе Хенкса (“ПанЭко”), содержащем 100 мг/л гентамицина-К (“KRKA”) и 20 мг/л флуконазола (“Pfizer”) в разных концентрациях. Затем суспензии смешивали с DMEM (“БиолоТ”) в соотношении 1:10, после чего добавляли к клеточной культуре и инкубировали в течение 24 ч. В контрольную группу клеток добавляли те же растворы, но без наночастиц. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью гемоцитометра. Живые и мертвые клетки различали путем окрашивания трипановым синим (“ПанЭко”).

Влияние сочетанного действия SiNPs и УЗИ на жизнеспособность клеток Нер-2 исследовали с помощью стандартного медицинского прибора на частоте 0.88 МГц с интенсивностью 0.05 Вт/см² и модуляцией 2/20 (рис. 1, а). Перед экспериментом клетки отделяли от подложек посредством трипсинизации и помещали в цилиндрическую стеклянную кювету, дно которой было приклеено к поверхности излучателя ультразвуковых волн. Кювета термостатировалась при 37°C. Наночастицы в концентрации 0.5 мг/мл добавляли к клеткам непосредственно перед обработкой УЗИ. Конечный объем суспензии клеток и наночастиц составлял 2 мл. Изменение числа клеток в процессе обработки определяли, подсчитывая общее число клеток и число живых клеток на гемоцитометре в пробах, взятых из суспензии. Жизнеспособность клеток определяли с помощью трипанового синего. Контрольная группа клеток подвергалась такой же обработке УЗИ, но без добавления наночастиц.

В экспериментах *in vivo* клетки карциномы легкого Льюис (CLL) трансплантировали мышам-самцам линии СВА ($n=20$) внутримышечно в левую заднюю лапу (по 5 животных в каждой группе). После достижения опухоли объема 210 ± 30 мм³

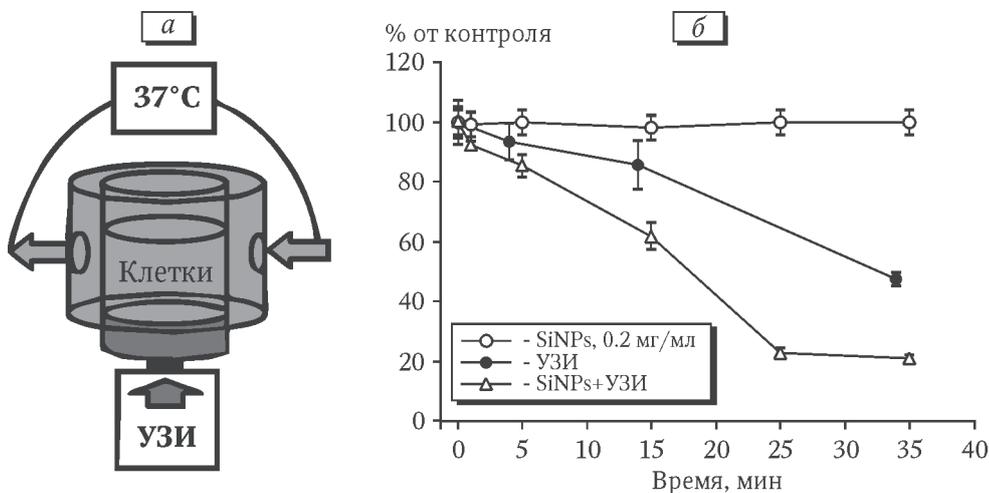


Рис. 1. Схема экспериментов *in vitro* (а), влияние УЗИ и SiNPs на выживаемость клеток Нер-2 (б).

на 8-е сутки после прививки вводили суспензию SiNPs (1 мг/мл) интратуморально по 0.5 мл (5 уколов по 0.1 мл). Данную процедуру повторяли на 11-е и 13-е сутки после перевивки опухоли. Через 15 мин после введения наночастиц проводили УЗИ в течение 6 мин (стандартный медицинский прибор “МедТекс”, частота 2.64 МГц, интенсивность 1 Вт/см²). Перед УЗИ зону опухоли депилировали. Для улучшения контакта между головкой излучателя и зоной опухоли использовался стандартный медицинский гель для УЗИ средней вязкости (“Медиагель Гельтек”). Величину ингибирования роста опухоли рассчитывали как $(-\Delta V/V_0) \times 100\%$, где ΔV и V_0 — усредненное по группе изменение объема опухоли и средний объем опухоли в контрольной группе соответственно. Положительное значение величины ингибирования свидетельствует о подавлении роста опухоли, в то время как отрицательное значение

указывает на рост объема опухоли в сравнении с контрольной группой. Контрольную группу составили интактные мыши.

Распределение наночастиц в опухоли исследовали на 5 мышах, которым на 10-е сутки после внутримышечной перевивки (в мышцу бедра левой задней лапы) интратуморально вводили коллоидный раствор частиц кремния. Мышей выводили из эксперимента через 15 мин, 1 ч, 24 ч и на 7-е и 13-е сутки после введения раствора кремния. Опухоли извлекали и подвергали общепринятой гистологической обработке [7]: фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезжировали в спиртах, пропитывали в хлороформе и парапласте, заливали в парапласт. Срезы толщиной в 5 мкм после депарафинирования по общепринятой схеме окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в канадский бальзам. Гистологические препараты анализировали и

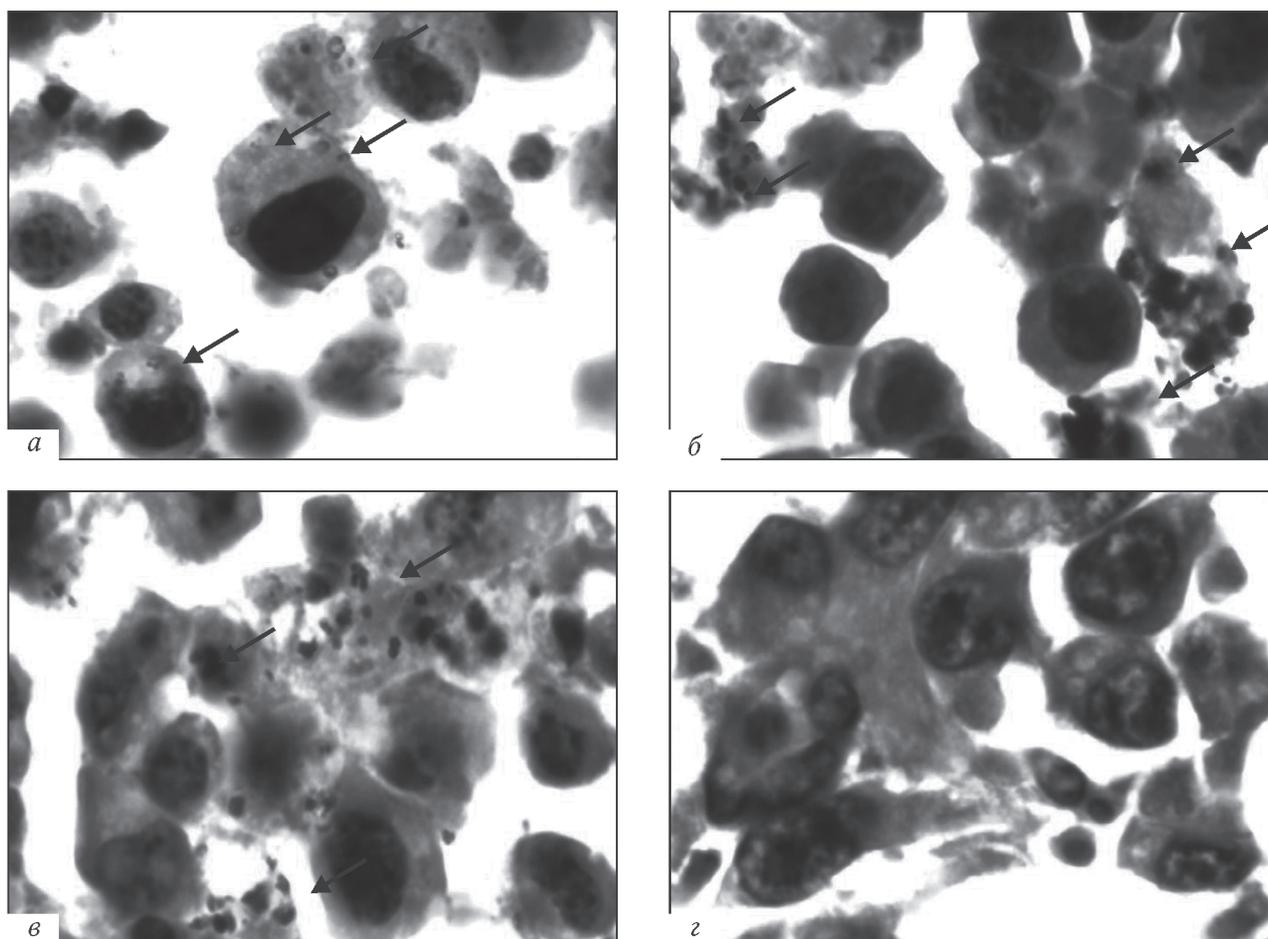


Рис. 2. Гистологические препараты карциномы легкого Льюис. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 400$. *а* — 15 мин после введения частиц: частицы в цитоплазме клеток; *б* — 1 ч после введения частиц: частицы в цитоплазме макрофагов; *в* — 24 ч после введения частиц: группы частиц разной величины и формы на поверхности погибших клеток, внеклеточно и в цитоплазме макрофагов; *г* — 13 сут после введения частиц: отсутствие каких-либо частиц в зоне рыхлого расположения опухолевых клеток. Расположение частиц указано стрелками.

фотографировали в световом микроскопе MC-300 "Micros" при увеличении 400.

Все эксперименты на животных проводились в РОНЦ им. Н.Н.Блохина в соответствии с принципами работы с лабораторными животными (Правила NIH № 85-23, пересмотр 1985 г.) и Европейской конвенцией о защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (протокол ETS 170).

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t* критерия Стьюдента. Достоверными принимали значения при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

SiNPs не проявляли цитотоксического действия на клетки Her-2 *in vitro* вплоть до концентрации 0.5 мг/мл. УЗИ приводило к гибели 50% клеток за 35 мин обработки, что, по-видимому, связано с разрушением клеток вследствие кавитации. Вместе с тем присутствие SiNPs в концентрации 0.2 мг/мл сенсibilizировало кавитационные эффекты УЗИ, что приводило к гибели до 90% клеток по отношению к контролю (рис. 1, б).

Гистологический анализ опухолей CLL после введения SiNPs представлен на рисунке 2. Через 15 мин после введения наночастиц часть из них обнаруживалась в цитоплазме клеток. SiNPs через 1 ч после введения обнаруживались также в цитоплазме макрофагов. Агломераты частиц разной величины и формы наблюдались как на поверхности погибших клеток, так и в цитоплазме макрофагов через 24 ч после введения. Через 13 сут наблюдения наночастиц в зоне рыхлого расположения опухолевых клеток не было, что, по-видимому, связано с макрофагальной активностью и элиминацией макрофагов в кровоток. Таким образом, 15-минутный интервал между введением наночастиц и воздействием УЗИ является оптимальным.

Исследование влияния SiNPs и УЗИ *in vivo* показало, что введение SiNPs, как и воздействие УЗИ после введения физиологического раствора, сопровождалось слабым подавлением роста опухоли на 8-е сутки после первого введения наночастиц (рис. 3). Это может быть объяснено слабым ингибирующим действием наночастиц и УЗИ на опухолевые клетки. В то же время на 10-12-е сутки эксперимента данный эффект нивелировался. Вместе с тем сочетанное воздействие SiNPs и УЗИ подавляло рост опухоли на $30 \pm 5\%$. При этом эффект подавления сохранялся вплоть до окончания эксперимента.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможном использовании био-

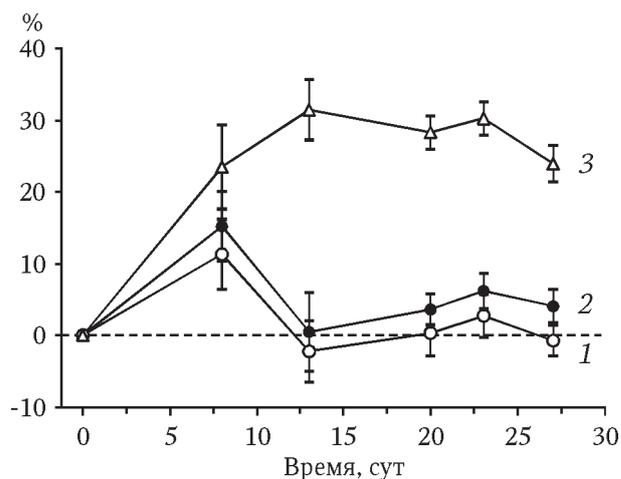


Рис. 3. Ингибирование роста опухоли CLL после введения SiNPs (1), после введения физиологического раствора и воздействия УЗИ (2) и после введения SiNPs с последующим воздействием УЗИ (3).

совместимых кремниевых наночастиц в сонодинамической терапии рака.

Авторы выражают благодарность канд. биол. наук И.Б.Меркуловой, канд. биол. наук Т.В.Абрамовой и Г.М.Прибыловой за проведение гистологического анализа.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 14-50-00029).

ЛИТЕРАТУРА

1. Дурнев А.Д., Соломина А.С., Даугель-Дауге Н.О., Жанатаев А.К., Шредер Е.Д., Немова Е.П., Шредер О.В., Велигура В.А., Осминкина Л.А., Тимошенко В.Ю., Середенин С.Б. Исследование генотоксичности и репродуктивной токсичности нанокристаллов кремния // Бюл. exper. биол. 2010. Т. 149, № 4. С. 429-433.
2. Николаев А.Л., Гопин А.В., Божевольнов В.Е., Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Мелихов И.В., Филоненко Д.В., Мазина С.Е., Герасимова Г.К., Хорошева Е.В., Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Бохан Б.Ю., Коган Б.Я., Калия О.Л. Комбинированная ультразвуковая терапия онкологических заболеваний // Рос. хим. журн. 2013. Т. 57, № 2. С. 83-99.
3. Осминкина Л.А., Лукьянова Е.Н., Гонгальский М.Б., Кудрявцев А.А., Гайдарова А.Х., Полтавцева Р.А., Кашкаров П.К., Тимошенко В.Ю., Сухих Г.Т. Влияние наноструктурированного кремния на процессы пролиферации стволовых и раковых клеток // Бюл. exper. биол. 2011. Т. 151, № 1. С. 91-95.
4. Chen H., Zhou X., Gao Y., Zheng B., Tang F., Huang J. Recent progress in development of new sonosensitizers for sonodynamic cancer therapy // Drug Discov. Today. 2014. Vol. 19, N 4. P. 502-509.
5. Kuroki M., Hachimine K., Abe H., Shibaguchi H., Kuroki M., Maekawa S., Yanagisawa J., Kinugasa T., Tanaka T.,

- Yamashita Y.* Sonodynamic therapy of cancer using novel sonosensitizers // *Anticancer Res.* 2007. Vol. 27, N 6A. P. 3673-3677.
6. *Low S.P., Voelcker N.H.* // *Handbook of Porous Silicon* / Ed. L. Canham. Cham, 2014. P. 381-393.
7. *Moiseeva E.V., Merkulova I.B., Bijleveld C., Koten J.W., Miroshnikov A.I., Den Otter W.* Therapeutic effect of a single peritumoural dose of IL-2 on transplanted murine breast cancer // *Cancer Immunol. Immunother.* 2003. Vol. 52, N 8. P. 487-496.
8. *Osminkina L.A., Gongalsky M.B., Motuzuk A.V., Timoshenko V.Y., Kudryavtsev A.A.* Silicon nanocrystals as photo- and sono-sensitizers for biomedical application // *Appl. Phys. B.* 2011. Vol. 105, N 3. P. 665-668.
9. *Osminkina L.A., Nikolaev A.L., Sviridov A.P., Andronova N.V., Tamarov K.P., Gongalsky M.B., Kudryavtsev A.A., Treshalina H.M., Timoshenko V.Yu.* Porous silicon nanoparticles as efficient sensitizers for sonodynamic therapy of cancer // *Micropor. Mesopor. Materials.* 2015. Vol. 210. P. 169-175.
10. *Serpe L., Foglietta F., Canaparo R.* Nanosonotechnology: the next challenge in cancer sonodynamic therapy // *Nanotechnol. Rev.* 2012. Vol. 1, N 2. P. 173-182.
11. *Shibaguchi H., Tsuru H., Kuroki M., Kuroki M.* Sonodynamic cancer therapy: a non-invasive and repeatable approach using low-intensity ultrasound with a sonosensitizer // *Anticancer Res.* 2011. Vol. 31, N 7. P. 2425-2429.

Получено 05.05.15
