

УДК 53.047

IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАЗЕРНО-АБЛИРОВАННЫХ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ КАК ДОЗОПОВЫШАЮЩИХ АГЕНТОВ ДЛЯ БИНАРНОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

© 2022 г. В. А. Скрибицкий^{a, b, *}, Ю. А. Финогенова^{a, b}, А. А. Липенгольц^{a, b, c},
Н. В. Позднякова^{a, b}, А. В. Смирнова^{a, b, d}, К. Е. Шпакова^{a, b}, Е. Ю. Григорьева^{a, b}

^aНациональный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия

^bНациональный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, 115409 Россия

^cГНЦ РФ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна, Москва, 123098 Россия

^dМосковский клинический научный центр имени А.С. Логинова ДЗМ, Москва, 111123 Россия

*E-mail: skvseva@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.05.2022 г.

После доработки 30.05.2022 г.

Принята к публикации 06.06.2022 г.

Золотые наночастицы (ЗНЧ) активно используют в качестве дозоповышающего агента для совместного применения с рентгеновским облучением. Синтез золотых наночастиц методом лазерной абляции имеет ряд преимуществ перед остальными методами, например, возможность создания химически чистого раствора и относительно малая стоимость производства при масштабировании синтеза. В данной работе проведено исследование дополнительного противоопухолевого эффекта от совместного применения золотых наночастиц, синтезированных методом лазерной абляции, при комбинированном действии с рентгеновским излучением. В исследовании использованы мыши с перевитой подкожно сингенной аденокарциномой Ca755. Облучение проводилось в дозе 10 Гр через 30 мин после введения ЗНЧ. В результате в опытной группе животных установлено 66% полных регрессий в течение 210 сут с момента перевивки, в то время как в контрольной облученной группе регрессии опухолевых узлов отсутствовали. Проведена оценка поглощенной дозы на стенки сосудов опухоли в присутствии золотых наночастиц в кровотоке: вследствие локального энерговыделения доза достигала 26.8 Гр.

Ключевые слова: золотые наночастицы, дозоповышающий агент, локальное увеличение дозы, опухолевая модель, торможение роста опухоли, рентгеновское излучение

DOI: 10.56304/S2079562922030502

ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы золота обладают всеми необходимыми свойствами для использования их в качестве платформы новых контрастных средств для КТ и/или дозоповышающих агентов для лучевой терапии [1–4]. Золото — биосовместимый материал, не вступающий в реакции с компонентами клеточных структур живого организма [5]. Модификация покрытия поверхности золотых наночастиц может обеспечить специфичное накопление в различных органах и тканях, например, придавая частицам тропность к онкомаркерам на поверхности опухолевых клеток [6]. Также золотые наночастицы способны проходить через поврежденный гематоэнцефалический барьер и не специфично накапливаться в паталогических очагах головного мозга [7]. Наночастицы золота,

введенные перед терапевтическим облучением опухоли, обладают свойством увеличивать локальное энерговыделение и способствуют торможению роста опухоли [8].

Существует много методов синтеза коллоидных растворов золотых наночастиц, однако наиболее распространенные среди них — это химический метод Туркевича и его различные модификации и физический метод лазерной абляции. Последний метод предоставляет возможность синтезировать химически чистые золотые наночастицы в деионизированной воде, и является более экономически выгодным при масштабировании до промышленного производства [9]. Однако для биомедицинских исследований чаще используют вариации метода Туркевича по причине его хорошей изученности и относительной простоте

синтеза в лабораторных условиях, не требующего дорогостоящего оборудования. Таким образом, вопрос применения лазерно-аблированных золотых наночастиц в биологических системах еще мало изучен.

Целью данной работы являлось исследование лазерно-аблированных золотых наночастиц в качестве дозоповышающего агента при облучении сингенных мышинных опухолей *in vivo* и оценка локального дозового увеличения в опухолевом узле.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез и характеристика ЗНЧ

Золотые наночастицы были синтезированы одностадийным методом фемтосекундной лазерной абляции в 1 мМ растворе NaCl. При наработке золотых наночастиц использовался Yb:KGW лазер (длина волны 1030 нм, длительность импульса 250 фс, энергия импульса 30 мкДж, частота следования лазерных импульсов 100 кГц) [10]. Золотые наночастицы покрывали по оригинальной методике полимером mPEG-SH 2 кДа. Оценку среднего размера и концентрации проводили спектрофотометрическим методом [11]. Измерение спектров поглощения коллоидного раствора золотых наночастиц проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм при 20°C с использованием спектрофотометра Cary 50 (Varian, Австралия). Для оценки гидродинамического диаметра золотых наночастиц использовали спектрометр динамического рассеяния света — лазерный корреляционный спектрометр Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания).

Для определения распределения размера золотых наночастиц в коллоидном растворе использовали сканирующий просвечивающий электронный микроскоп MAIA 3 (TESCAN, Чехия).

Опухолевая модель

В исследовании использованы самки мышей линии C57Bl/6 (ИЦИГ, Россия) с перевитой подкожно аденокарциномой молочной железы Ca755. Инокулят готовили *ex tempore*: 7% суспензия опухолевых клеток в растворе Хэнкса. Инокулят вводили подкожно в правую заднюю лапу животного в объеме 0.05 мл. Для проведения облучения животные были разделены на 3 группы: контроль ($n = 6$) (животные без терапии), облученный контроль ($n = 6$) (облученные животные) и опытная группа ($n = 6$) (облученные животные с введением ЗНЧ). Все эксперименты с использованием лабораторных животных были осуществлены в соответствии с официальными национальными этическими нормами.

Облучение и визуализация

Облучение проводили при достижении размера опухоли объема $\sim 150\text{--}200\text{ мм}^3$. За 30 мин до облучения опытной группе животных внутривенно вводили коллоидный раствор ЗНЧ в дозе $975 \pm 113\text{ (мг Au)/кг}$. Для облучения использовали установку РУСТ-М1 при напряжении 200 кВ и токе 5 мА. Индивидуальную дозиметрию проводили с использованием дозиметрических пленок Gafchromic EBТ3©. Средняя поглощенная доза в объеме опухоли составила $10.7 \pm 0.2\text{ Гр}$. Через 1 ч после облучения проводили визуализацию опухолевого узла методом микроКТ на доклиническом трехмодальном томографе ПЭТ/ОФЭКТ/КТ VEC-Tor6 CT (MiLabs, Нидерланды).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика ЗНЧ

Синтезирован и подготовлен к внутривенному введению животным коллоидный раствор золотых наночастиц. Средний диаметр золотого ядра составил $8.2 \pm 1.4\text{ нм}$, концентрация золота в коллоидном растворе $160 \pm 8\text{ (мг Au)/мл}$. Мода гидродинамического диаметра составила 17 нм. На рис. 1 представлено изображение электронной микроскопии ЗНЧ и их распределение по размеру. По полученному распределению можно сделать вывод, что средний диаметр золотого ядра наночастиц составляет $8 \pm 4\text{ нм}$.

Дополнительный противоопухолевый эффект ЗНЧ

В результате исследования дополнительного противоопухолевого эффекта от комбинированного применения ЗНЧ и рентгеновского излучения были построены кривые выживаемости, представленные на рис. 2.

В опытной группе у 66% животных наблюдалась полная регрессия опухолевого узла. Животных с полной регрессией опухоли наблюдали в течение 210 сут без признаков рецидива опухоли. В других группах (контрольной и облученной без ЗНЧ) полных регрессий не наблюдалось.

Механизм гибели опухолевых клеток при комбинированном применении ЗНЧ и рентгеновского излучения может включать повреждение ДНК, оксидативный стресс, нарушение клеточного цикла и индукцию апоптоза [12, 13]. Однако в данном случае наиболее вероятной причиной регрессии опухолевого узла является повреждение опухолевых сосудов. Как видно на компьютерных томограммах (рис. 3), полученных через 1 ч после рентгеновского облучения, золото присутствует в кровеносных сосудах. Концентрация золота в крови мыши через 1 ч после облучения экспериментально была оценена как $12 \pm 2\text{ (мг Au)/мл}$ [14]. Согласно работе [15], данная концентрация

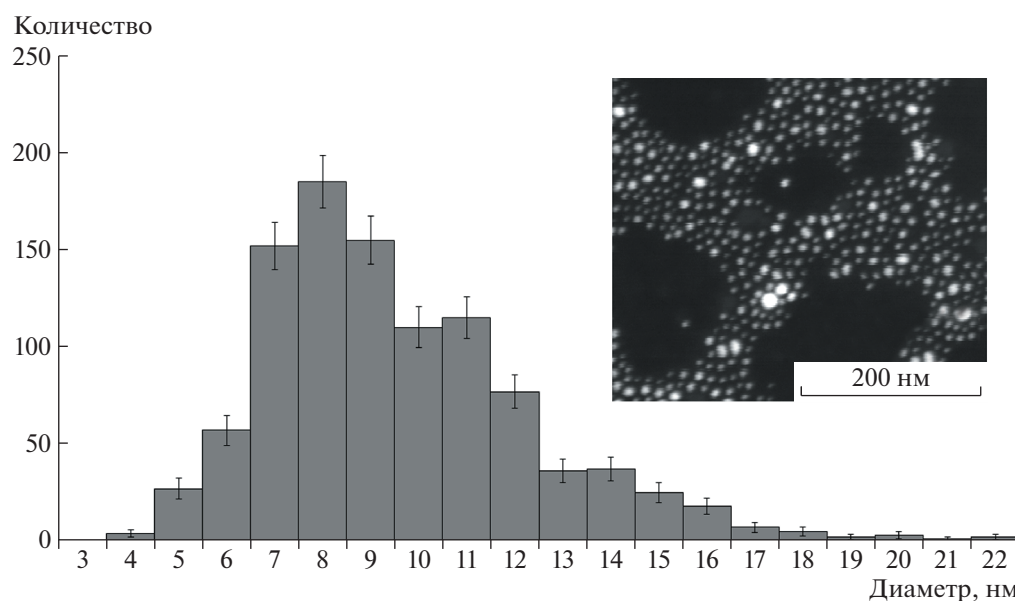


Рис. 1. Электронная микроскопия ЗНЧ, используемых в данном исследовании и их распределение по размеру.

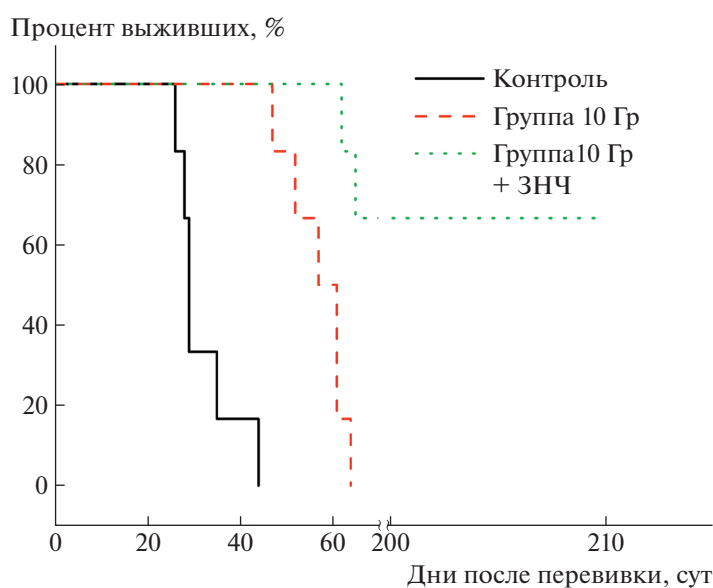


Рис. 2. Кривые выживаемости (сплошная линия — контрольная группа, пунктирная линия — контрольная облученная группа, точечная линия — опытная группа).

золота соответствует коэффициенту локального увеличения дозы равному 2.5. Присутствие дозоповышающего агента в кровотоке при облучении опухоли способствует увеличению поглощенной дозы на стенки сосудов и их повреждению [16]. Таким образом оцененная поглощенная доза на стенки сосудов опухоли составила 26.8 Гр.

На 15 сут после облучения всем животным из опытной группы была выполнена микроКТ. Отмечалось сохранение золота в фасциях поражен-

ной лапы, в том числе у мышей с полной регрессией опухоли, а также накопление золота в печени и селезенке у всех мышей. Впоследствии мышам с полной регрессией микроКТ проводилась раз в месяц. Сохранение золота в фасциях пораженной лапы отмечалось вплоть до последней временной точки наблюдения 210 сут (рис. 4). Ни в одну временную точку не было зафиксировано снижения рентгеноплотности печени и селезенки, что указывает на отсутствие экскреции золотых наночастиц.

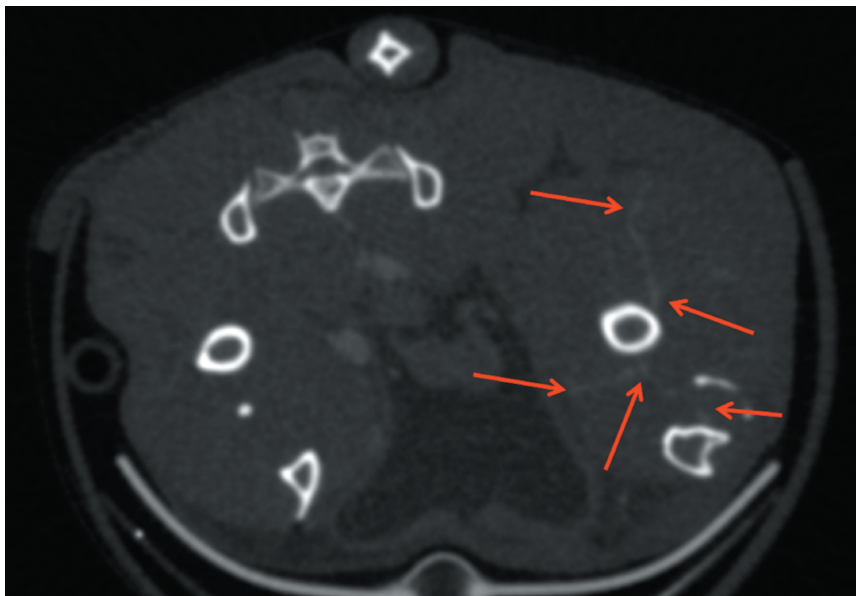


Рис. 3. Аксиальный срез КТ изображения тазобедренной области мыши из опытной группы через 1 ч после введения золотых наночастиц. Красными стрелками указаны крупные сосуды правой задней лапы мыши с опухолевым узлом.

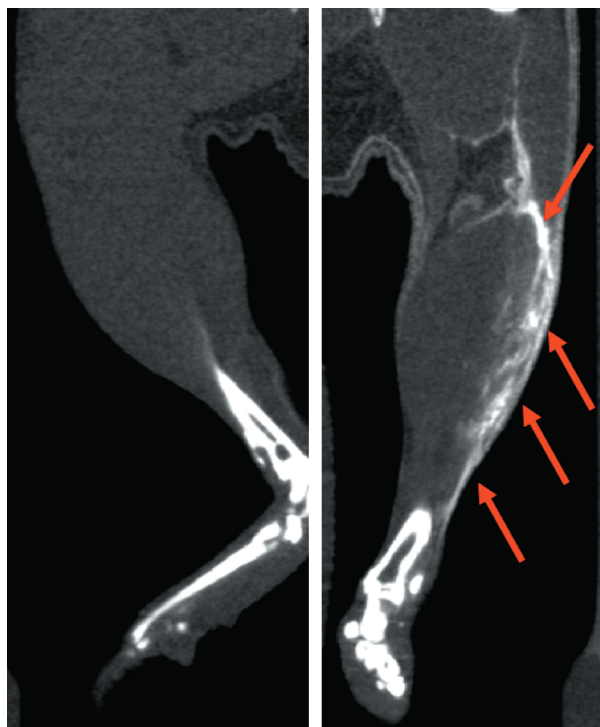


Рис. 4. Корональный срез КТ изображения задних лап мыши из опытной группы на 210 сут после перевивки. Слева изображена левая здоровая лапа, справа — правая лапа мыши, куда была перевита опухоль и впоследствии наступила полная регрессия, красные стрелки указывают на золотой след в фасциях мышц.

Сразу после введения коллоидного раствора наночастиц золота через хвостовую вену животного, наблюдали изменение цвета кожи на нешерстистых участках тела: уши, нос, лапы и хвост мышей приобретали цианотичный (синий) цвет (рис. 5). В течение всего периода наблюдения возвращения цвета кожи к нормальному не наблюдалось. Подобный эффект наблюдался ранее другими исследователями у пациентов [17, 18].

Несмотря на изменение цвета кожи и длительное сохранение золота в печени и селезенке, не было зафиксировано снижения массы тела, нарушения потребления воды и корма, изменений в поведении у животных из опытной группы в течение всего периода наблюдения после установления факта регрессии, что косвенно указывает на отсутствие долгосрочных токсических эффектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы показана возможность использования лазерно-аблированных золотых наночастиц в качестве готового тераностического препарата. Показана возможность контрастировать мелкие сосуды опухолевого узла на перевивной мышечной аденокарциноме молочной железы Ca755. Также проведен модельный эксперимент *in vivo* с локальным увеличением дозы в сосудах опухоли при наличии в них ЗНЧ.

В результате исследования дополнительного терапевтического эффекта при совместном использовании ЗНЧ и рентгеновского излучения в

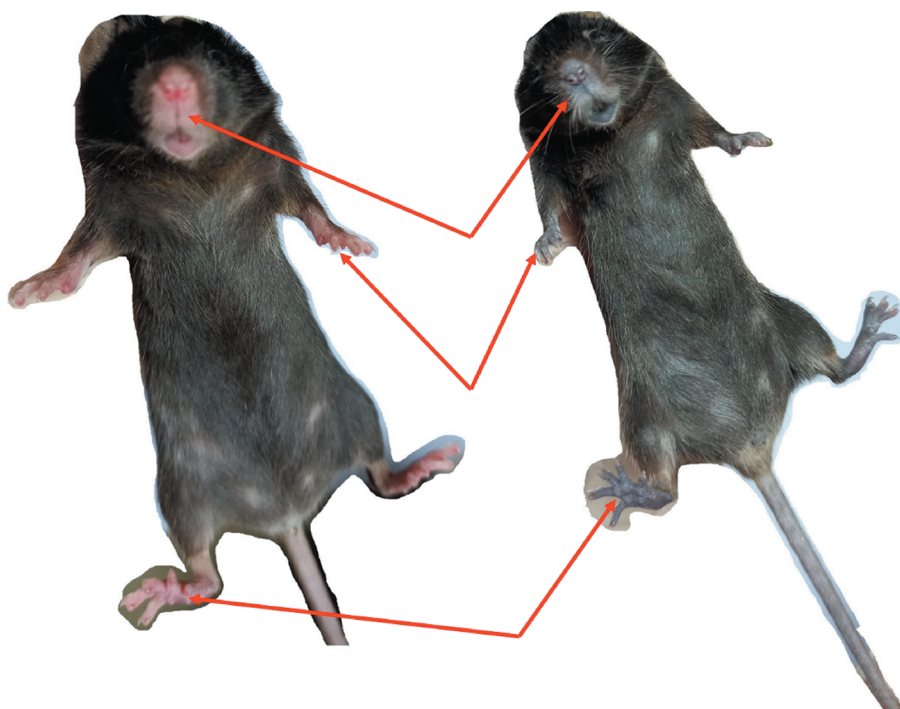


Рис. 5. Изменение цвета кожи мышей после введения золотых наночастиц. Справа показана здоровая мышь до введения золотых наночастиц. Слева мышь из опытной группы на 210 сут после перевивки, которой вводили золотые частицы. Красными стрелками указаны нешерстистые участки, изменившие цвет кожи.

опытной группе было установлено наличие 66% полных регрессий в течение 210 дней с момента перевивки. Вероятно, данный процент регрессий объясняется наличием большого количества золота в сосудах опухоли на момент облучения и их повреждением. По аналитической оценке, поглощенная доза на стенки сосудов в данной работе составила 26.8 Гр.

В течение всего срока наблюдения за животными, достигшими полной регрессии, не было зафиксировано негативных эффектов в результате введения ЗНЧ с последующим облучением. Получен результат, косвенно указывающий на отсутствие путей экскреции ЗНЧ из печени, селезенки и фасций мышц. Изменение цвета кожи в результате введения ЗНЧ не оказывает значимых негативных эффектов на состояние животных, содержащихся в лабораторных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Gao Q., Zhang J., Gao J., et al. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. P. 1.
2. Medici S., Peana M., Coradduzza D., et al. // Seminars in Cancer Biology. 2021. New York: Academic. V. 76. P. 27.
3. Kulakov V.N., Lipengolts A.A., Grigorieva E.Yu., et al. // Zh Oncol.: Diag. Radiol. Radiother. 2018. V. 1 (4). P. 82 (in Russian).
4. Kulakov V.N., Lipengol'ts A.A., Grigor'eva E.Y., et al. // Pharmaceut. Chem. J. 2016. V. 50 (6). P. 388.
5. Sani A., Cao C., Cui D. // Biochem. Biophys. Rep. 2021. V. 26. P. 100991.
6. Goddard Z.R., Marín M.J., Russell D.A., et al. // Chem. Soc. Rev. 2020. V. 49 (23). P. 8774.
7. Hainfeld J.F., Smilowitz H.M., O'Connor M.J., et al. // Nanomedicine. 2013. V. 8 (10). P. 1601.
8. Chen Y., Yang J., Fu S., et al. // Int. J. Nanomed. 2020. V. 15. P. 9407.
9. Jendrzey S., Gökce B., Eppe M., et al. // Chem. Phys. Chem. 2017. V. 18 (9). P. 1012.
10. Popov A.A., Zelepukin I.V., Tikhonowski G.V., et al. // J. Phys.: Conf. Ser. 2021. V. 2058 (1). P. 012004.
11. Skribitsky V.A., Pozdniakova N.V., Lipengolts A.A., et al. // Biophysics. 2022. V. 67 (1). P. 22.
12. Rosa S., Connolly C., Schettino G., et al. // Cancer Nanotechnol. 2017. V. 8 (1). P. 1.
13. Cui L., Her S., Borst G.R., et al. // Radiother. Oncol. 2017. V. 124 (3). P. 344.
14. Hainfeld J.F., O'Connor M.J., Dilmanian F.A., et al. // Brit. J. Radiol. 2011. V. 84 (1002). P. 526.
15. Roeske J.C., Nunez L., Hoggarth M., et al. // Technol. Cancer Res. Treatm. 2007. V. 6 (5). P. 395.
16. Lipengolts A.A., Vorobyeva E.S., Finogenova Yu.A., et al. // Med. Phys. 2019. V. 84 (4). P. 16 (in Russian).
17. Schamberg J.A. Y.F. // Arch. Dermatol. Syphilol. 1928. V. 18 (6). P. 862.
18. Fleming C.J., Salisbury E.L., Kirwan P., et al. // J. Am. Acad. Dermatol. 1996. V. 34 (2). P. 349.

In Vivo Studies of Laser-Ablated Gold Nanoparticles as Dose Enhancers for Binary Radiotherapy of Cancer

V. A. Skribitsky^{1, 2, *}, Yu. A. Finogenova^{1, 2}, A. A. Lipengolts^{1, 2, 3},
N. V. Pozdniakova^{1, 2}, A. V. Smirnova^{1, 2, 4}, K. E. Shpakova^{1, 2}, and E. Yu. Grigorieva^{1, 2}

¹*Blokhin National Medical Research Centre of Oncology,*

Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 115478 Russia

²*National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia*

³*Burnasyan Federal Medical Biophysical Centre, Federal Medical Biological Agency of Russia (FMBA), Moscow, 123098 Russia*

⁴*Loginov Moscow Clinical Research Practical Centre of the Moscow Healthcare Department, Moscow, 111123 Russia*

**e-mail: skvseva@yandex.ru*

Received May 30, 2022; revised May 30, 2022; accepted June 6, 2022

Abstract—Gold nanoparticles (GNPs) are actively used as a dose enhancement agent in combination with X-ray irradiation. The synthesis of gold nanoparticles by laser ablation has a number of advantages over other methods. For example, the possibility of creating a chemically pure solution and a relatively low production cost when synthesis is scaled up. In this work, we studied an antitumor effect from the combined use of gold nanoparticles (synthesized by laser ablation) and X-rays. Mice with syngeneic adenocarcinoma Ca755, transplanted subcutaneously, were used for the study. The tumor was irradiated at a dose of 10 Gy in 30 min post injection of GNPs. As a result, 66% of complete regressions were found in the experimental group of animals within 210 days from the moment of inoculation. There were no regressions of tumor in the control irradiated group. The absorbed dose to the walls of tumor vessels in the presence of gold nanoparticles in the bloodstream was evaluated as 26.8 Gy.

Keywords: gold nanoparticles, dose enhancement agent, local dose enhancement, tumor model, tumor growth suppression, X-rays