

УДК 620.3

НАНОЧАСТИЦЫ ФТОРИДА ЛЮТЕЦИЯ (LuF_3) КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ НАНОРАДИОСЕНСИБИЛИЗАТОР ДЛЯ ТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ

© 2025 г. Д. А. Винник^а, М. В. Романов^б, С. Н. Корякин^с, В. К. Иванов^д, А. Л. Попов^{а, *}

^аИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, 142290 Россия

^бИнститут биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

^сМедицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал “НМИЦ радиологии” МЗ РФ, Обнинск, 249036 Россия

^дИнститут общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова, Москва, 119991 Россия

*E-mail: antonpopovleonid@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2024 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 18.06.2024 г.

В работе представлены результаты исследования физико-химических характеристик и радиосенсибилизирующих свойств нового типа наночастиц фторида лютеция (LuF_3), как перспективного нанорадисенсибилизатора при облучении рентгеновскими лучами клеток меланомы линии B16/F10. В рамках данной работы нами проведен комплексный анализ функциональных характеристик синтезированных наночастиц LuF_3 , анализ их цитотоксичности, а также продемонстрировано их радиосенсибилизирующее действие *in vitro*. Показано, что наночастицы LuF_3 имеют гидродинамический диаметр менее 200 нм, а полученный на их основе коллоидный золь обладает высокой стабильностью за счет использования биосовместимого стабилизатора — цитрата аммония. Наночастицы LuF_3 обеспечивают цитотоксический и радиосенсибилизирующий эффект по отношению к клеткам меланомы в концентрациях от 116 мг/мл и выше, через снижение их метаболической активности и мембранного митохондриального потенциала, а также инициации апоптоза. Такой наноматериал может лечь в основу при создании перспективных современных подходов повышения эффективности лучевой терапии.

Ключевые слова: наночастицы, лютеций, фториды, радиосенсибилизатор, цитотоксичность

DOI: 10.56304/S2079562925010269

ВВЕДЕНИЕ

Одним из подходов в создании перспективных нанорадисенсибилизаторов является использование веществ, способных эффективно поглощать ионизирующее излучение и переизлучать его в виде фотонов или электронов [1]. Облучение фторсодержащих соединений рентгеновскими лучами может индуцировать радиолуминесценцию, что приводит к генерации электронов, которые запускают процессы повреждения клеточных структур [2]. Хорошим кандидатом на такое соединение может быть фторид лютеция, который обладает выраженной радиолуминесценцией. Исходя из данных Международного агентства по изучению рака и Национального института рака, лучевая терапия является одним из методов лечения онкологии, который применяется совместно с другими методами. Лучевая терапия может применяться как самостоятельный метод, так и в комбинации с химиотерапией в рамках программ

лечения рака [3–5]. Исследования показали, что различные типы наночастиц усиливают радиочувствительность раковых клеток путем регуляции различных биологических процессов, включая развитие окислительного стресса, повреждение ДНК, остановку клеточного цикла, апоптоз, аутофагию и механизмы, связанные с гипоксией [6–14]. Также показано, что наночастицы на основе металлов высоким атомным номером (Z) усиливают радиочувствительность опухолевых клеток [15–17]. Наночастицы с высоким Z обладают свойствами, за счет которых повышают вероятность фотоэлектрических эффектов и взаимодействий комптоновского рассеяния [18–20]. При облучении фторсодержащих соединений рентгеновскими лучами индуцируется процесс радиолуминесценции, что является физической основой прямого повреждающего действия таких материалов, в случае их нахождения в цитоплазме или лизосомах опухолевых клеток [21–22]. Таким образом использование фторидов редкоземельных элементов в виде

наночастиц рассматривается как один из наиболее перспективных подходов в повышении эффективности лучевой и адронной терапии.

В рамках данной работы нами синтезированы цитрат-стабилизированные наночастицы фторида лютеция, а также проведен комплексный анализ их цитотоксичности и радиосенсибилизирующего действия *in vitro* на культуре клеток меланомы мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для синтеза золь наночастиц LuF_3 в качестве исходных реагентов использовали $\text{Lu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Ланхит, 99.9%), HF (ос.ч., Сигма Тек), цитрат аммония двузамещенный (х.ч., Sigma-Aldrich), изопропанол (ос.ч., Химмед), этиленгликоль (х.ч., Sigma Aldrich). Нитрат лютеция (2.345 г) растворяли в 17 мл этиленгликоля при нагревании до 60°C и интенсивном перемешивании на магнитной мешалке. 0.885 мл HF (40% по массе) растворяли в 150 мл изопропанола. Полученный раствор прикапывали к раствору нитратов РЗЭ при интенсивном перемешивании, наблюдали формирование суспензии. Осадок из суспензии отделяли фильтрованием через бумажный фильтр (“Синяя лента”), промывали изопропанолом, помещали в сушильный шкаф на 30–60 минут (50°C) для удаления изопропанола и редиспергировали влажный гелеобразный осадок в 100 мл деионизованной воды. К полученной суспензии при интенсивном перемешивании приливали раствор цитрата аммония (1.134 г цитрата аммония в 100 мл деионизованной воды). Полученный золь перемешивали при $30\text{--}35^\circ\text{C}$ до удаления изопропанола. Размер и форму наночастиц определяли методом растровой электронной микроскопии. Гидродинамический диаметр и дзета-потенциал наночастиц определяли с помощью анализатора BetterSize Zeta 90. УФ-спектр золь наночастиц анализировали на спектрофотометре DS-11 FX+ (DeNovix, США). Рентгенофазовый анализ полученных порошков осуществляли с помощью порошкового рентгеновского дифрактометра Bruker D8 Advance (излучение $\text{CuK}\alpha$) в диапазоне углов (2θ) $20\text{--}90^\circ$ с шагом 0.02° , выдержкой 0.1 сек/шаг и накоплением в течение 40–60 минут. Анализ дифрактограмм проводили с помощью базы данных ICDD PDF2 (2012). Оценку размеров областей когерентного рассеяния (ДОКР) проводили по формуле Шеррера, профили пиков аппроксимировали псевдофункциями Войта. Анализ цитотоксичности и радиосенсибилизирующего действия проводили с использованием клеток линии B16/F10 культивировались в среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной эмбриональной сыворотки. Культивирование производилось в 96-луночных планшетах в плотности $(2.5\text{--}3.0) \cdot 10^4$ клеток/см² для последующей инкубации с образцами наночастиц

(1000, 500, 250 и 125 мкМ) в течение 24, 48 и 72 ч, соответственно. Анализ цитотоксичности наночастиц проводили с использованием метода МТТ теста. После инкубации клеток с наночастицами среда заменялась на раствор МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) в среде без сыворотки в концентрации 0.5 мг/мл. Через 3 ч среда с МТТ заменялась на ДМСО, планшеты помещались на шейкер на 10 мин, после чего измерялась оптическая плотность растворов формазана в лунках планшетов при длине волны света 540 нм. Полученная оптическая плотность прямо пропорционально связана с количеством формазана, восстановленного из МТТ клеточными NADPH-зависимыми оксидоредуктазами, и, таким образом, косвенно коррелирует с метаболической активностью и жизнеспособностью клеток. Величины оптической плотности пересчитывались в проценты от соответствующих значений контрольных групп, отклонения в выборках указывались в виде стандартного отклонения (SD). Значимость отклонений между выборками и контролем подтверждалась с использованием *t*-критерия Уэлча при $0.01 < p < 0.05$ (*), $0.001 < p < 0.01$ (**), $0.0001 < p < 0.001$ (***) и $p < 0.0001$ (****) с использованием GraphPad Prism.

Анализ выживаемости клеток проводили методом флуоресцентной микроскопии (Live Dead тест) после инкубации клеток в присутствии образцов наночастиц среда заменялась на раствор смеси флуоресцентных красителей Hoechst 33342 (связывается с ДНК всех клеток, длина волны возбуждения 350 нм, длина волны испускания 460 нм) и йодида пропидия (связывается с ДНК только мертвых клеток, длина волны возбуждения 535 нм, длина волны испускания 615 нм) в буферном растворе Хэнкса. Через 15 мин клетки промывались однократно буферным раствором Хэнкса, после чего проводилось их фотографирование на инвертированном флуоресцентном микроскопе. С использованием программы ImageJ велся подсчет количества мертвых и всех клеток, затем составлялось их процентное соотношение. Анализ мембранного митохондриального потенциала (ММП): после инкубации клеток в присутствии образцов среда заменялась на раствор красителя TMRE (тетраметилродамин, этиловый эфир; положительно заряженный, красно-оранжевый краситель, связывается с активными митохондриями из-за их относительно отрицательного заряда, длина волны возбуждения 552 нм, длина волны испускания 574 нм) в буферном растворе Хэнкса, после чего проводилось их микрофотографирование на флуоресцентном микроскопе. С использованием программы ImageJ производился подсчет интенсивности флуоресценции. Величины интенсивности флуоресценции пересчитывались в проценты от соответствующих значений контрольных групп, отклонения в выборках указывались в виде стан-

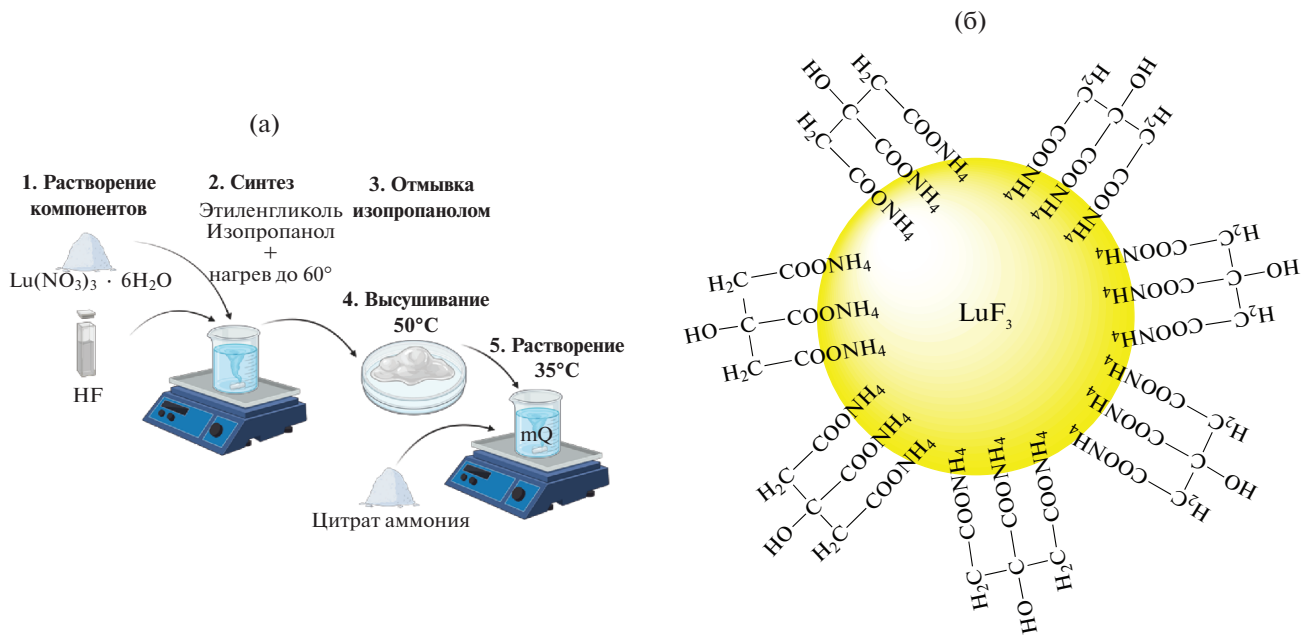


Рис. 1. Схема синтеза LuF_3 (а) и схематическое изображение структуры наночастиц LuF_3 (б).

дартного отклонения (SD). Облучение клеток меланомы B16/F10 проводили на рентгеновском терапевтическом аппарате РУТ-15 («Мосрентген», Россия) в дозе 2 и 4 Гр при мощности дозы 1

Гр/мин., напряжении 200 кВ, токе 20мА и фокусном расстоянии 37.5 см. Статистическая обработка данных выполнялась с использованием программы GraphPad Prism 8.0. Значимость отклоне-

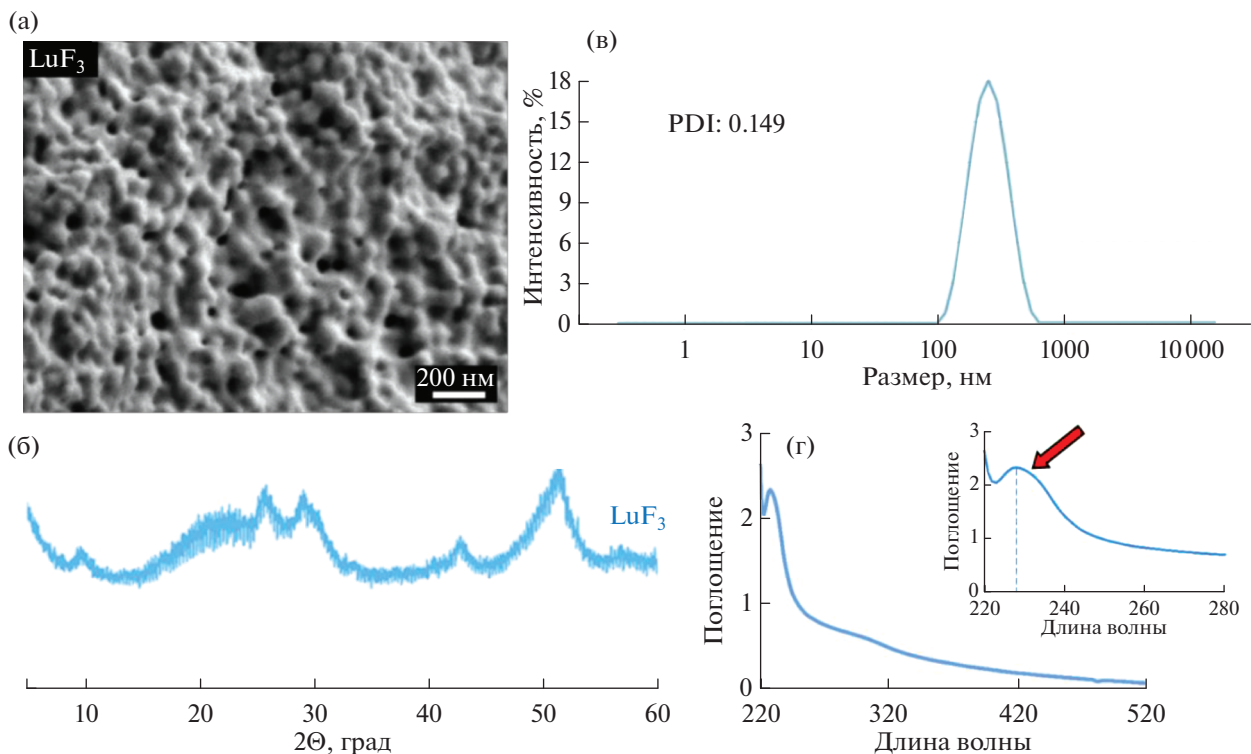


Рис. 2. Анализ физико-химических характеристик наночастиц LuF_3 . Растровая электронная микроскопия (а) и рентгеновская дифрактограмма (б), распределение частиц по размерам (гидродинамический радиус) и индекс полидисперсности (в), УФ-видимый спектр поглощения (г).

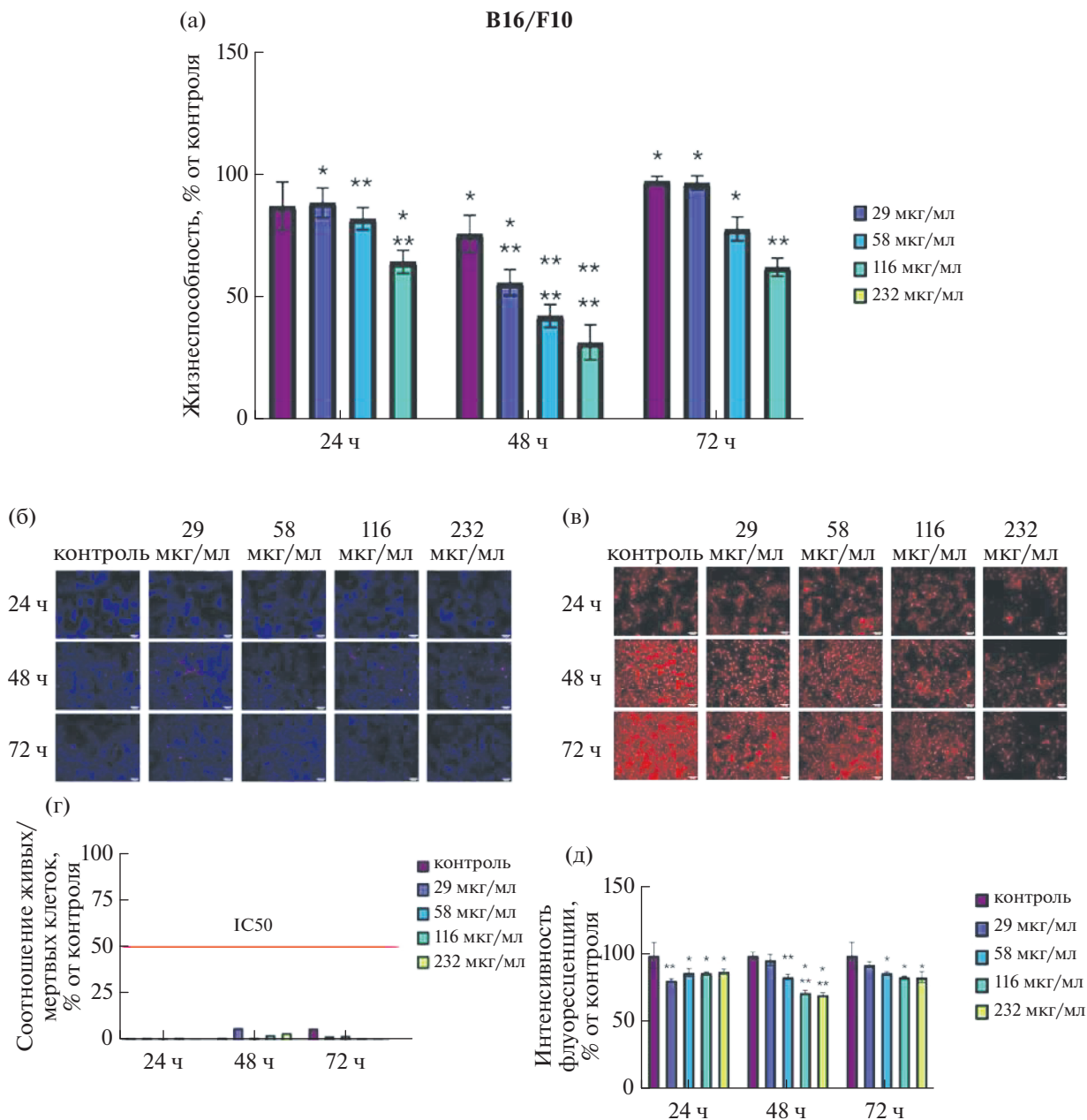


Рис. 3. МТТ-тест на клетках B16/F10 через 24, 48 и 72 ч инкубации клеток в присутствии наночастиц LuF_3 в различных концентрациях (а). Значения метаболической активности клеток указаны в процентах от контроля. Микрофотографии клеток, окрашенных красителями Hoechst (синий) и PI (красный) для проведения LD-теста (б). Анализ жизнеспособности клеток B16/F10 через 24, 48 и 72 ч инкубации клеток в присутствии наночастиц LuF_3 в различных концентрациях (125–1000 мкМ) (г). Значения указаны в процентном соотношении числа мертвых клеток к общему их количеству. Микрофотографии окрашенных клеток для TMRE-теста (в). Анализ митохондриального потенциала через 24, 48 и 72 ч инкубации клеток в присутствии наночастиц LuF_3 в различных концентрациях (д). Значения интенсивности флуоресценции клеток указаны в процентах от контроля.

ний между выборками и контролем подтверждались с использованием t -критерия Уэлча при $0.01 < p < 0.05$ (*), $0.001 < p < 0.01$ (**), $0.0001 < p < 0.001$ (***) и $p < 0.0001$ (****).

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Был проведен комплексный анализ физико-химических характеристик синтезированных

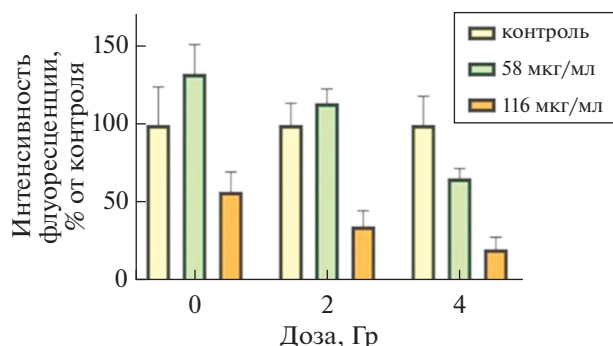


Рис. 4. Анализ мембранного митохондриального потенциала клеток меланомы через 72 ч соинкубации с наночастицами LuF_3 и облучения рентгеновскими лучами *in vitro*.

наночастиц широким спектром методов. Синтез наночастиц фторида лютеция осуществляли гидротермальным способом через осаждение нитрата лютеция с плавиковой кислотой в этиленгликоле (рис. 1а, 1б).

В качестве биосовместимого стабилизатора был использован цитрат аммония. Анализ размера наночастиц методом растровой электронной микроскопии подтвердила высокую степень монодисперсности и сферическую форму (около 20–50 нм) (рис. 2а). Рефлексы на дифрактограмме образца LuF_3 (рис. 2б) соотносятся с рефлексами соединения $(\text{H}_3\text{O})\text{Yb}_3\text{F}_{10}(\text{H}_2\text{O})$ (пространственная группа $\text{Fd}\bar{3}m$, карточка PDF2 № 88–364). Карточка аналогичного соединения лютеция в базе данных отсутствует, однако, исходя из близости свойств катионов РЗЭ, а также близости радиусов Yb^{3+} и Lu^{3+} , можно предположить, что полученный осадок имеет схожую структуру и представляет собой гидрат кислой фторидной соли лютеция. Значительное уширение рефлексов на дифрактограммах осадков, полученных в ходе синтеза LuF_3 , свидетельствует о малом размере частиц. Гидродинамический диаметр нанокомпозиата при формировании суспензии в дистиллированной воде составил 193 нм (рис. 2в). Зета-потенциал нанокомпозиата -16 ± 1 мВ. УФ-видимый спектр наночастиц LuF_3 представлен на рис. 2г.

Цитотоксичность наночастиц LuF_3 , оценивали путем анализа дегидрогеназной активности на клетках мышины меланомы B16/F10 (рис. 3а). Показано, что наночастицы проявляют цитотоксичность при повышении концентрации. В тесте жив/мертв наночастицы LuF_3 не продемонстрировали значимого влияния на выживаемость клеток B16/F10 (рис. 3б, 3г). Также нами была проведена оценка митохондриального мембранного потенциала (ММП). ММП использовали в качестве надежного маркера окислительно-восстановительного статуса клеток и их метаболической активности.

Эксперименты показали, что культивирование клеток с наночастицами во всем диапазоне концентраций приводил к снижению их ММП после 24, 48 и 72 ч культивирования (рис. 4в, 4д), что говорит о снижении метаболической активности клеток при повышении концентрации наночастиц в среде.

Окраска потенциал-чувствительным красителем TMRE показала, что присутствие наночастиц в концентрации 58 мкг/мл вызывает повышение значений ММП в группе, не подвергавшейся облучению и в группе подвергавшейся облучению в 2 Гр, но при концентрации LuF_3 116 мкг/мл значения ММП в этих группах относительно контроля снижаются. Однако в группе, которая подверглась действию ионизирующего излучения в 4 Гр значения ММП снижаются при всех концентрациях наночастиц (рис. 4). Таким образом клетки меланомы после облучения, которые предварительно сокультивировались с наночастицами LuF_3 , обладают меньшей пролиферативной активностью и мембранным митохондриальным потенциалом по сравнению с клетками без наночастиц, что свидетельствует о радиосенсибилизирующем эффекте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирован и охарактеризован новый тип цитрат-стабилизированных наночастиц LuF_3 , перспективный в качестве нанорадиосенсибилизатора. Полученный золь наночастиц обладает высокой степенью монодисперсности и коллоидной стабильности. Наночастицы LuF_3 проявляет цитотоксический эффект по отношению к клеткам меланомы мыши линии B16/F10 в концентрациях от 116 мг/мл и выше, через снижение ММП и запуск процесса апоптоза. Разработанные наночастицы могут лечь в основу при разработке эффективного тераностического агента для терапии онкологических заболеваний в рамках курса лучевой и адронной терапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-73-10231, <https://rscf.ru/project/22-73-10231/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Mundekkad D., Cho W.C. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23 (3). P. 1685. <https://doi.org/10.3390/ijms23031685>
2. Ferro-Flores G., Ancira-Cortez A., Ocampo-García B., Meléndez-Alafort L. // Nanomaterials. 2024. V. 14 (3). P. 296. <https://doi.org/10.3390/nano14030296>

3. World Cancer Report. Stewart B.W., Wild C.P. (Eds.). 2014. Lyon: International Agency for Research on Cancer (WHO). <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>.
4. Types of Cancer Treatment. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>.
5. Radiotherapy in Cancer Care: Facing the Global Challenge. Rosenblatt E., Zubiarreta E. (Eds.). 2017. Vienna: IAEA. <https://www.iaea.org/publications/10627/radiotherapy-in-cancer-care-facing-the-global-challenge>.
6. De Volder M.F.L., Tawfick S.H., Baughman R.H., Hart A.J. // *Science*. 2013. V. 339. P. 535. <https://doi.org/10.1126/science.1222453>
7. Chen G., Roy I., Yang C., Prasad P.N. // *Chem. Rev.* 2016. V. 116. P. 2826–2885. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00148>
8. Lane L.A., Qian X., Nie S. // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. P. 10489–10529. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00265>
9. Lim E.-K., Kim T., Paik S., Haam S., Huh Y.-M., Lee K. // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. P. 327–394. <https://doi.org/10.1021/cr300213b>
10. Peng L., Hu L., Fang X. // *Adv. Funct. Mater.* 2014. V. 24. P. 2591–2610. <https://doi.org/10.1002/adfm.201303367>
11. Xie J., Gong L., Zhu S., Yong Y., Gu Z., Zhao Y. // *Adv. Mater.* 2019. V. 31. P. 1802244. <https://doi.org/10.1002/adma.201802244>
12. Liu Y., Zhang P., Li F., Jin X., Li J., Chen W., Li Q. // *Theranostics*. 2018. V. 8. P. 1824–1849. <https://doi.org/10.7150/thno.22172>
13. Song G., Cheng L., Chao Y., Yang K., Liu Z. // *Adv. Mater.* 2017. V. 29. P. 1700996. <https://doi.org/10.1002/adma.201700996>
14. Sisin N.N.T., Mat N.F.C., Rashid R.A., Dollah N., Razak K.A., Geso M., Algethami M., Rahman W.N. // *Int. J. Nanomed.* 2022. V. 17. P. 3853–3874. <https://doi.org/10.2147/ijn.s370478>
15. Sun H., Wang X., Zhai Sh. // *Nanomaterials*. 2020. V. 10 (3). P. 504. <https://doi.org/10.3390/nano10030504>
16. Rashid R.A., Abidin S.Z., Anuar M.A.K., et al. // *Open-Nano*. 2019. V. 4. P. 100027.
17. Hao Y., Altundal Y., Moreau M., Sajo E., Kumar R., Ngwa W. // *Phys. Med. Biol.* 2015. V. 60 (18). P. 7035–7043.
18. Rahman W.N., Corde S., Yagi N., Abdul Aziz S.A., Annabell N., Geso M. // *Int. J. Nanomed.* 2014. V. 9. P. 2459–2467.
19. Delorme R., Taupin F., Flaender M., Ravanat J.L., Champion C., Agelou M., Elleaume H. // *Med. Phys.* 2017. V. 44 (11). P. 5949–5960.
20. Gerken L.R.H., Gerdes M.E., Pruschy M., Herrmann I.K. // *Mater. Horiz.* 2023. V. 10 (10). P. 4059–4082.
21. Cooper D.R., Kudinov K., Tyagi P. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014. V. 16 (24). P. 12441–12453.
22. Kudinov K.A., Cooper D.R., Ha J.K., Hill C.K., Nadeau J.L., Seuntjens J.P., Bradforth S.E. // *Radiat. Res.* 2018. V. 190 (1). P. 28–36.

Lutetium Fluoride (LuF₃) Nanoparticles as Promising Nanoradiosensitizers for Melanoma Therapy

D. A. Vinnik¹, M. V. Romanov², S. N. Koryakin³, V. K. Ivanov⁴, and A. L. Popov¹, *

¹ *Institute for Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

² *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

³ *Tsyb Medical Radiological Research Centre, National Medical Research Radiological Centre,
Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga oblast, 249031 Russia*

⁴ *Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: antonpopovleonid@gmail.com

Received May 30, 2024; revised June 17, 2024; accepted June 18, 2024

Abstract—Results are presented from studying physicochemical characteristics and radiosensitizing properties of a new type of lutetium fluoride (LuF₃) nanoparticle as a promising nanoradiosensitizer for X-ray irradiation of B16/F10 melanoma cells. A comprehensive analysis is performed of functional characteristics of synthesized LuF₃ nanoparticles, their cytotoxicity, and their radiosensitizing effect in vitro. It is shown that LuF₃ nanoparticles have a hydrodynamic diameter of less than 200 nm. Colloidal sol obtained on their basis is highly stable as a result of using the biocompatible stabilizer ammonium citrate. LuF₃ nanoparticles have a cytotoxic and radiosensitizing effect on melanoma cells in concentrations of 116 mg/mL and higher by reducing their metabolic activity and membrane mitochondrial potential while initiating apoptosis. Such nanomaterial can form the basis of promising modern approaches to increasing the effectiveness of radiation therapy.

Keywords: nanoparticles, lutetium, fluorides, radiosensitizer, cytotoxicity