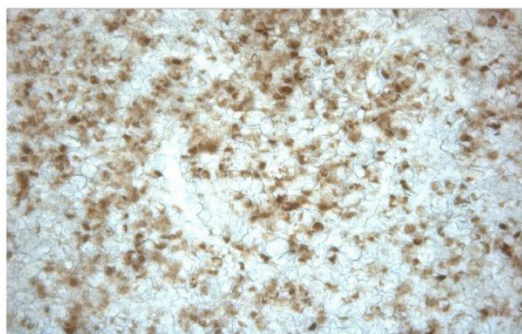
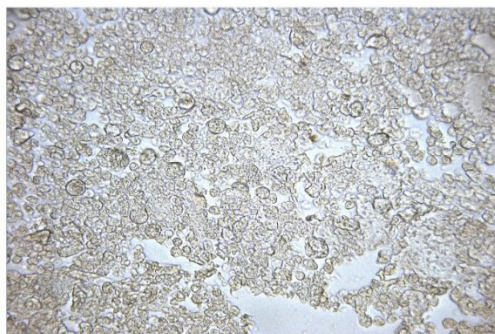


anti-CA-125 + GAM-Px



anti-IL-6 + GAM-Px



УДК 57.043; 577.34

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

М.В. Улитко^{1,2}, Т.Р. Султанова¹, Р.А. Вазиров¹, С.Ю. Соковнин^{1,3}, В.Г. Ильвес³

¹ Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

² Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург, Россия

³ Институт электрофизики УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных методов лечения онкологических заболеваний является лучевая терапия. Механизм радиационного воздействия основан на структурно-метаболических изменениях клеток, приводящих к нарушению их функций, подавлению пролиферативной активности и разрушению опухолевой ткани [1]. Однако ионизирующее излучение вызывает изменения не только в опухоли, но и в окружающих ее нормальных тканях, что приводит к необходимости поиска способов снижения повреждающего воздействия на здоровые клетки при сохранении положительного лечебного эффекта от лучевой терапии.

Одним из самых перспективных и стремительно развивающихся направлений является нанобиотехнология. Маленькие размеры, а также большая удельная поверхность наночастиц повышает их реакционную и каталитическую активность. Это открывает широкие перспективы для применения наноматериалов во многих областях медицины [2, 3]. Значительный интерес для исследования представляют наночастицы диоксида церия (CeO_2), проявляющие ферментоподобные свойства, за счёт чего они способны оказывать цитопротекторное, а в некоторых случаях, цитотоксическое действие на клетки. Кроме того, наночастицы CeO_2 могут проявлять радиопротекторные свойства по отношению к здоровым клеткам, защищая их от радиационно-индуцированного окислительного стресса, поддерживая высокий уровень дегидрогеназной активности, снижая количество апоптотических клеток и уровень активных форм кислорода, что позволяет в перспективе использовать эти наночастицы в медицинской сфере при радиотерапии опухолевых заболеваний [4–6].

В данной работе исследуется влияние наночастиц CeO_2 на радиочувствительность культур нормальных и опухолевых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на культуре дермальных фибробластов человека, выделенной из биоптата кожи в Институте медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург и на клеточной культуре карциномы шейки матки человека HeLa, полученной из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург. Клетки помещали в 96-луночные планшеты в посевной дозе 2×10^5 кл/мл и культивировали 24 часа в CO_2 инкубаторе Sanyo (Panasonic) MCO-18AC при температуре 37°C в атмосфере с 5 % CO_2 , 95 % влажности с использованием питательной сред Игла DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия) и гентамицина в дозе 50 мкг/мл. Для морфологических исследований клетки культивировались на покровных стёклах в 6-луночных планшетах.

Исследовали радиомодифицирующие свойства мезопористого нанопорошка CeO_2 , полученного методом испарения импульсным электронным пучком в газе низкого давления на установке НАНОБИМ-2 в Институте электрофизики УрО РАН. Синтезированные нанопорошки имеют размер зерен от 3 до 5 нм и высокую удельную поверхность до $190 \text{ м}^2/\text{г}$., при этом размер агломератов достигал 300 – 1000 нм. Для получения стабильной суспензии наночастиц использовали стабилизатор цитрат натрия. Водные растворы наночастиц CeO_2 вносили в клеточные культуры в конечных концентрациях 0,05 мкг/мл и 0,1 мкг/мл.

Облучение образцов проводилось на установке для рентгенотерапии Xstrahl 300 (100–320 кэВ) с источником излучения ^{60}Co в Свердловском областном онкологическом диспансере. Образцы подвергались облучению с энергией 150 кэВ, мощность поглощенной дозы в образце составляла 62 сГр/мин. Контроль поглощенной дозы проводился с использованием термолюминесцентных дозиметров ТЛД-500 [7] и цветowych дозиметров СО ПД (Э) – 1/10 [8]. Облучение образцов проводилось в дозах 5 Гр, 10 Гр и 15 Гр. Расхождение поглощенной дозы в объёме образцов не превышало 2 %.

Для оценки биологического эффекта экспериментального воздействия через 72 часа определяли морфометрические показатели и жизнеспособность клеток. Оценку жизнеспособности проводили с помощью стандартного МТТ-теста [9] с использованием автоматического спектрофотометрического планшетного сканера Tecan Infinite M200 PRO. Перед морфометрическим исследованием клетки фиксировали на стеклах и окрашивали по Романовскому-Гимза, после чего с помощью микроскопа Axio lab. A1 и программы ImageJ определяли площадь клеток и ядер, вычисляли ядерно-цитоплазматический индекс. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 10. Вычислялось среднее арифметическое, стандартное отклонение и ошибку среднего. Для оценки значимости различий между контрольными и экспериментальными образцами клеток использовали критерий Манна-Уитни. При вероятности ошибки (p) < 0,05 различия между средними значениями считали достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента выявлены различия в воздействии наночастиц CeO_2 на нормальные и опухолевые клетки. В то время как наночастицы не оказали токсического действия на дермальные фибробласты, в клетках линии HeLa наблюдается нарушение морфофункционального состояния, что может являться следствием оксидазоподобной активности наночастиц в закисленной среде опухолевых клеток и усиления окислительных процессов.

При облучении нормальных фибробластов при добавлении наночастиц CeO_2 в концентрации 0,05 мкг/мл наблюдается повышение жизнеспособности клеток при дозах облучения 5 Гр и 10 Гр, что свидетельствует о проявлении радиопротекторных свойств наночастиц CeO_2 (рис. 1).

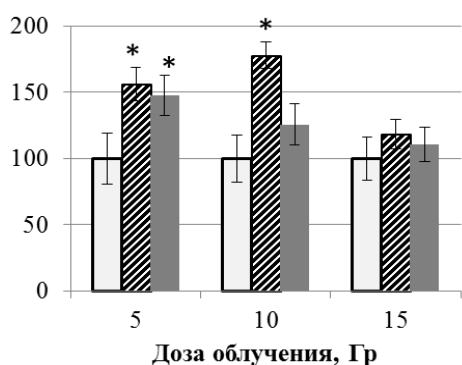


Рис. 1. Влияние облучения на жизнеспособность клеточной культуры дермальных фибробластов человека после введения наночастиц CeO_2

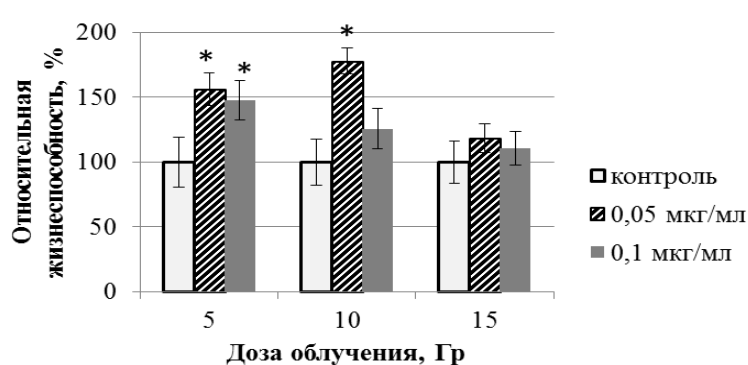


Рис. 2. Влияние облучения на жизнеспособность клеточной культуры дермальных фибробластов человека после введения наночастиц CeO_2

Примечание * – различие с контролем достоверно ($p < 0,05$)

Облучение в дозах 5 Гр и 10 Гр на фоне введения наночастиц CeO_2 приводит к снижению ядерно-цитоплазматического отношения за счёт уменьшения размеров ядра и увеличения площади цитоплазмы клеток (рис. 2) и появлению в культуре удлинённых клеток веретенообразной формы, свидетельствующем о дифференцировке фибробластов в более зрелые фиброциты (рис. 3).

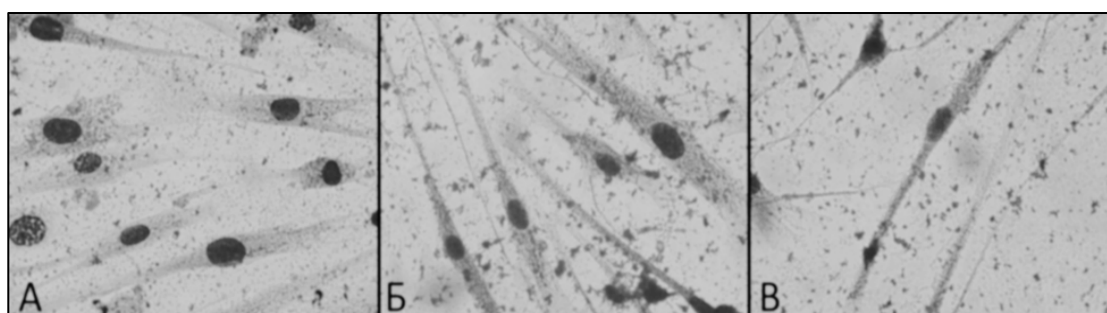
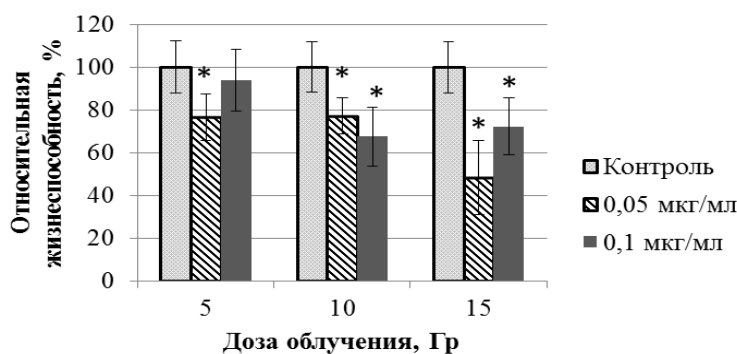


Рис. 3. Воздействие облучения 5 Гр на морфологию дермальных фибробластов при добавлении наночастиц CeO_2 , ув. 400: А) Без наночастиц CeO_2 ; Б) 0,05 мкг/мл; В) 0,1 мкг/мл



Примечание: * - различие с контролем достоверно ($p < 0,05$)

Рис. 4. Влияние облучения на жизнеспособность клеточной культуры HeLa после введения наночастиц CeO_2

При облучении опухолевых клеток HeLa на фоне введения наночастиц CeO_2 наблюдается снижение их жизнеспособности, что говорит о радиосенсибилизации опухолевых клеток (рис. 4). Ядерно-цитоплазматическое отношение клеток HeLa при облучении увеличивается за счёт уменьшения площади цитоплазмы, при этом наблюдается фрагментация и пикноз ядер, свидетельствующие об апоптозе клеток (рис. 5).

Таким образом, в ходе эксперимента выявлены различия влияния наночастиц диоксида церия на морфофункциональное состояние нормальных и опухолевых клеток и их чувствительность к действию ионизирующего облучения. Наночастицы диоксида церия не влияют на жизнеспособность дермальных фибробластов человека, однако оказывают цитотоксический эффект в отношении клеточной культуры HeLa.

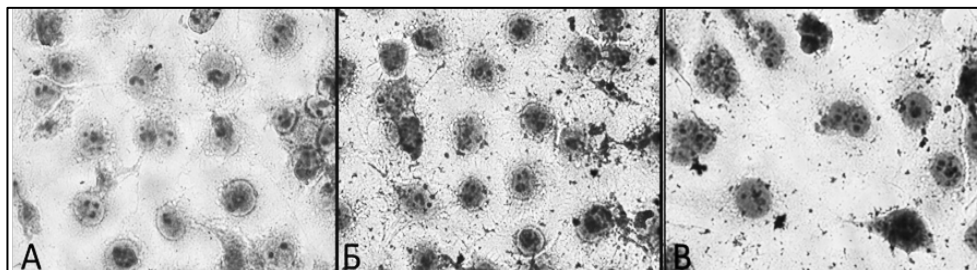


Рис. 5. Воздействие облучения 5 Гр на морфологию клеток HeLa при добавлении наночастиц CeO_2 , ув. 400: А) Без наночастиц CeO_2 ; Б) 0,05 мкг/мл; В) 0,1 мкг/мл

Установлены особенности радиомодифицирующего действия наночастиц диоксида церия по отношению к нормальным и опухолевым клеткам. На фибробласты человека данные наночастицы оказали радиопротекторное действие, повысив их жизнеспособность после облучения и ускорив при этом дифференцировку фибробластов в более зрелые формы – фиброциты. Радиозащитные свойства могут быть следствием антиоксидантной активности частиц, которая позволяет инактивировать возникающие под действием ионизирующего облучения свободные радикалы и перекись водорода. На опухолевые клетки наночастицы CeO_2 действуют как радиосенсибилизаторы, поскольку в кислой среде клеток HeLa их антиоксидантная активность снижается, и процессы окисления усиливаются.

Уникальные ферментоподобные свойства наночастиц диоксида церия в сочетании с их низкой токсичностью позволяет найти им эффективное применение в радиотерапии. Дальнейшее исследование механизмов действия наночастиц диоксида церия на живые системы может дать толчок для развития новых эффективных способов лечения пациентов с различными онкологическими заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА

- C. Michael, Joiner Albert van der Kogel, Basic clinical radiobiology, 4th edition A Hodder Arnold Publication, 2009. P. 375. 12.
- AshaRani P.V. et al. Approaches to safe nanotechnology. Managing the health and safety concerns associated with engineered nanomaterials // DHHS (NIOSH). 2009. № 125. – 104 p.
- Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е. Наночастицы: фармакологические надежды и токсикологические проблемы // Казанский медицинский журнал. – 2008. – Т. 89, № 1. – С. 1–7.
- Wason M.S., Zhao J. Cerium oxide nanoparticles: potential applications for cancer and other diseases // American journal of translational research. – 2013. – V. 5, № 2. – P. 126–131.
- Colon J. et al. Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2009. – V. 5, № 2. – P. 225–231.
- A.L. Popov et al. Radioprotective effects of ultra-small citrate-stabilized cerium oxide nanoparticles RSC Advances, 2016, 6, 106141–106149
- C. Reuven, W.S. Stephen, McKeever, Theory of thermoluminescence and related phenomena, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1997.
- Милинчук В.К., Клишпонт Э.Р., Тупиков В.И. Основы радиационной стойкости органических материалов. М.: Энергоатомиздат, 1994. С. 256.
- T. Mosmann, J. Immunol. Meth., 1983, 65, 55.