

УДК 616–006.04:615.2

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

© 2009 Ю.С. Сидоренко¹, Е.Ю. Златник¹, Л.В. Передреева¹, В.Б. Бородулин²

¹Ростовский научно-исследовательский онкологический институт

²Саратовский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 5.10.2009

Проведено экспериментальное изучение действия введения наночастиц (НЧ) металлов (Zn, Cu, Fe и их сплава) на рост перевиваемых опухолей мышей: асцитной саркомы 37 и солидной саркомы 180. НЧ вводили в область опухоли в суммарной дозе 20 мкг на мышь. Контрольным группам вводили физиологический раствор. Изучали динамику роста опухоли, состояние опухолевых клеток, выживаемость и продолжительность жизни мышей. Установлено, что НЧ обладают выраженным противоопухолевым эффектом, вызывая регрессию опухоли вплоть до полной, повышение процента погибших и дистрофически измененных опухолевых клеток и способствуя увеличению продолжительности жизни подопытных мышей без внешних признаков интоксикации.

Ключевые слова: *наночастицы, металлы, противоопухолевый эффект*

Нанотехнологии являются важнейшим современным направлением, охватывающим различные области науки, в том числе, медико-биологические. В настоящее время синтезированы различные наноразмерные частицы, среди которых наночастицы металлов, фуллеренов, конъюгаты частиц железа с доксорубицином, полупроводниковых частиц SiO₂ с поливинилпирролидоном и др. [1]. Результаты исследования биологической активности НЧ показывают перспективность их применения в онкологии [2]. Роль металлов в различных реакциях, протекающих в организме, хорошо известна [3], однако в настоящее время имеются только единичные сведения о влиянии на биологические процессы металлов в виде НЧ, хотя именно они в силу своего размера обладают повышенной способностью к проникновению в клетки и встраиванию в различные метаболические цепи. Нами ранее было показано антипролиферативное действие НЧ меди, цинка, железа на модели культур опухолевых клеток, а также на рост ткани рака легкого человека в диффузионных камерах, имплантированных в брюшную полость крыс [4, 5].

Целью данной работы является экспериментальная оценка влияния введения наночастиц металлов на опухолевый рост.

Материалы и методы. В работе были использованы НЧ (размер 300-1000 Å),

представляющие собой ультрадисперсные порошки металлов (Cu, Zn, Fe) и их сплава, синтезированные на Саратовском плазмохимическом комплексе ГНЦ ГНИИХТЭОС. Экспериментальное исследование проводили на моделях двух перевиваемых опухолей мышей: быстрорастущей асцитной саркоме 37 и медленно растущей солидной саркоме 180. На обеих моделях изучали влияние введения НЧ металлов на регрессию опухоли; кроме того, на первой оценивали состояние опухолевых клеток, а на второй – выживаемость и продолжительность жизни опухоленосителей. В опытах использовали 40 белых беспородных мышесамцов массой 18-20 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Для перевивки саркомы 37 20 мышам вводили внутривентриально по 0,1 мл асцитической жидкости опухоленосителя, разведенной в 0,2 мл среды 199, после чего опухоль росла в течение 4-х суток. Затем, когда происходило очевидное увеличение объема живота мышей, начинали ежедневное внутривентриальное введение взвеси НЧ металлов (Zn, Cu или Fe) в концентрации 10 мкг/мл по 0,5 мл. Контрольная группа мышесамцов аналогичным образом получала по 0,5 мл физиологического раствора. НЧ вводили в течение 4-х дней, суммарная доза составляла 20 мкг/мышь. Затем введение прекращали и наблюдали животных еще в течение 4-х дней, чтобы оценить стойкость полученного эффекта. Таким образом, опухоль развивалась 12 дней, из них первые 4 дня и последние 4 дня НЧ мышам не вводили. Доза НЧ была выбрана исходя из средних доз современных металлосодержащих цитостатиков (препаратов платины), применяемых в клинической практике, и составила 1 мг/кг массы. На 13-е сутки у каждой мыши шприцом удаляли асцитическую жидкость (АЖ), измеряли

Сидоренко Юрий Сергеевич, академик РАН и РАМН, директор. E-mail: rnoi@list.ru

Златник Елена Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии

Передреева Лариса Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии

Бородулин Владимир Борисович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии. E-mail: borodulinvb@mail.ru

ее объем. В пробах АЖ определяли количество опухолевых клеток путем подсчета в камере Горяева и процент погибших клеток, окрашивающихся трипановым синим; рассчитывали абсолютное количество живых опухолевых клеток на каждое животное по формуле:

$$N = V_{\text{АЖ}} \times n \times \%_{\text{ЖК}},$$

где N - абсолютное количество живых опухолевых клеток на каждую мышшь; V - объем АЖ; n - количество опухолевых клеток в 1 мл АЖ; ЖК - живые опухолевые клетки.

Солидный компонент опухоли, развивающийся в брюшной полости, измеряли, фиксировали формалином, окрашивали гематоксилином Карачи и изучали с помощью световой микроскопии. Саркому 180 перевивали 20 мышам под кожу спины, где она росла в течение 3-х недель до размера 20-40 мм³. Затем мышам начинали введение взвеси НЧ металлов

в опухоль по 0,2 мл в концентрации 10 мкг/мл НЧ Zn, НЧ Cu и НЧ сплава (Zn+Cu+Fe), животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Введение НЧ осуществляли в течение 5 недель 1 раз в 3-4 дня, всего было выполнено 10 инъекций, суммарная доза НЧ составила 20 мкг на каждую мышшь. Объем опухолей еженедельно измеряли и выражали в мм³. Кроме того, отмечали общее состояние и падеж животных. Срок наблюдения после начала введения НЧ составил 15 недель, в том числе, 10 недель после завершения введения НЧ. Статистическую обработку всех исследованных показателей проводили с использованием t-критерия Стьюдента и критерия Уилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты. Результаты изучения влияния введения НЧ металлов на рост саркомы 37 и количество ее клеток у мышшей опытных и контрольной групп представлены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние введения НЧ металлов на рост саркомы 37 у мышшей

Группы мышшей	Объем		Количество опухолевых клеток	
	АЖ (мл)	солидной опухоли (мм ³)	n (10 ⁶ /мл АЖ)	N (10 ⁶ /мышшь)
Контроль	1,79±0,36	574±95	27,7±2,86	23,98±10,5
НЧ Zn	0,78±0,31*	154±88*	1,67±0,5*	0,636±0,2*
НЧ Cu	2,16±0,68**	374±90	8,13±1,54* **	11,1±3,53**
НЧ Fe	3,3±1,0**	322±112	8,26±2,37* **	17,7±5,7**

Примечание: * - статистически достоверные отличия от контроля; ** - статистически достоверные отличия от данных, полученных с НЧ Zn (P<0,05)

Как видно из таблицы 1, у мышшей всех групп с перевивной саркомой 37 в брюшной полости обнаружена АЖ, минимальный объем ее отмечен у животных, получавших НЧ Zn, а максимальный - у животных, получавших НЧ Fe. При этом статистически достоверные отличия от контрольной группы, демонстрируют только мыши, которым вводили НЧ Zn: у них объем АЖ был статистически значимо ниже, чем в контрольной группе. У животных этой же опытной группы объем АЖ был меньше, чем у мышшей, которым вводили НЧ других металлов (Cu и Fe).

Аналогичные различия установлены по количеству опухолевых клеток в АЖ мышшей. Минимальное количество живых опухолевых клеток как на 1 мл АЖ, так и на каждую мышшь определялось у животных, получавших НЧ Zn, а максимальное - у животных контрольной группы. Введение НЧ Zn приводит к статистически значимому снижению абсолютного количества живых клеток саркомы 37 не только по сравнению с контрольной группой (их уровень составлял всего 2,6% от контроля), но и по сравнению с мышшами, которым вводили НЧ Cu и НЧ Fe. Количество живых опухолевых клеток у

мышшей, получавших НЧ Cu и НЧ Fe, рассчитанное на 1 мл АЖ, было статистически достоверно ниже, чем у контрольных животных. Однако в пересчете на каждую мышшь указанные различия были статистически недостоверны из-за вариабельности индивидуальных данных. Показатели, характеризующие количество опухолевых клеток в АЖ мышшей, которым вводили НЧ Cu и Fe, не имели статистически достоверных различий между собой.

Солидный компонент саркомы 37 был также наименьшим у мышшей, получавших НЧ Zn (табл. 1). Результаты его гистологического исследования у опытных и контрольных животных представлены в таблице 2 и на рисунках 1-4. В опухолях мышшей, получавших НЧ Zn, капсула была значительно толще, чем у контрольных. При действии НЧ Zn между очагами опухолевых клеток наблюдались обширные поля некроза (рис. 2А) и жировой дистрофии (рис. 2Б), тогда как у контрольных животных отмечались крупные очаги с плотным или разреженным расположением опухолевых клеток (рис. 1).

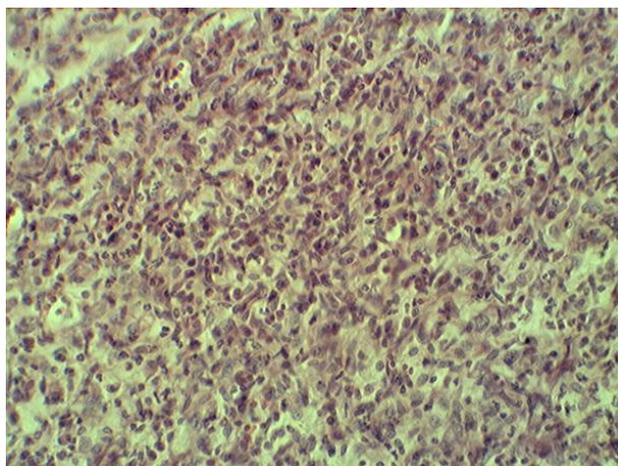
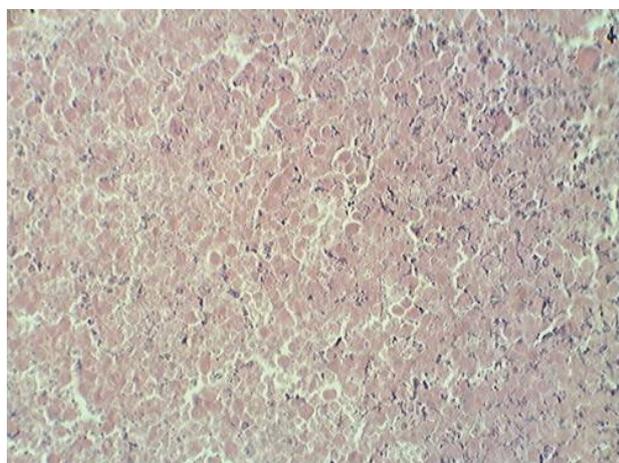
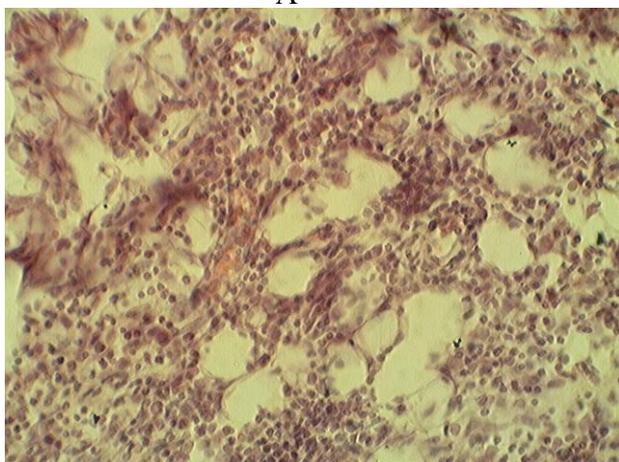


Рис.1. Саркома 37 (контроль). Окраска гематоксилином. Ув. х400.



А

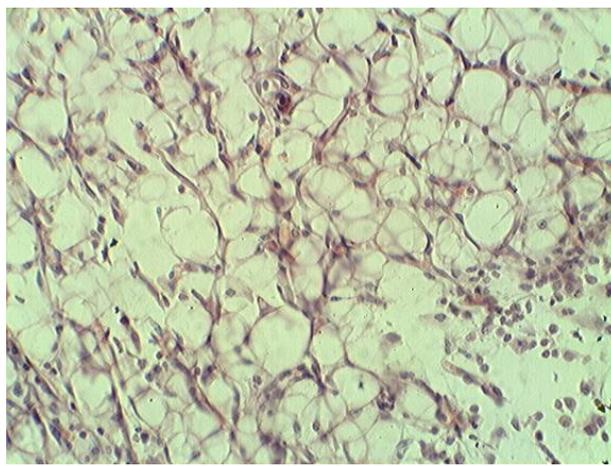


Б

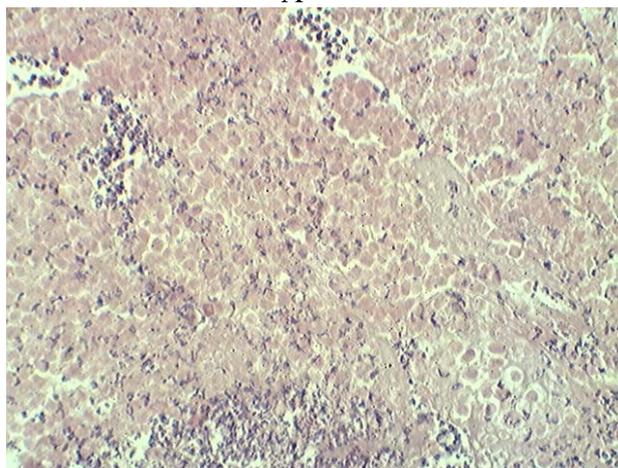
Рис.2. Саркома 37 (введение НЧ Zn). Окраска гематоксилином. Ув. х400.

А – поле некроза, Б – жировая дистрофия

Введение НЧ Cu приводило к сходным изменениям (рис. 3А, 3Б), а после введения НЧ Fe участки некроза были незначительными, а размер и характер очагов опухоли были близки к контрольным пробам (рис. 4).



А



Б

Рис. 3. Саркома 37 (введение НЧ Cu). Окраска гематоксилином. Ув.х400.

А –жировая дистрофия, Б – поле некроза

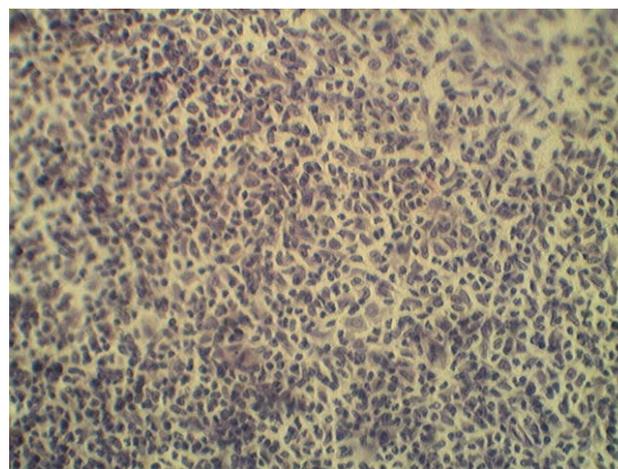


Рис. 4. Саркома 37 (действие НЧ Fe). Окраска гематоксилином. Ув. х400.

Клетки саркомы 37 представлены двумя генерациями: крупными полигональными с оксифильной цитоплазмой и небольшими овальными с базофильной цитоплазмой, каждый из видов образует разные очаги. У животных, получавших НЧ Fe, преобладали клетки первой генерации, а у мышей, которым

вводили НЧ Cu, – второй. Встречались гигантские клетки, количество которых в контроле составляло до 20 в поле зрения, при действии НЧ Fe до 17, НЧ Cu – до 10, НЧ Zn – до 8 в поле зрения. Количество опухолевых клеток, находящихся в состоянии митоза, также было минимально при действии НЧ Zn

и составляло 1-2 в поле зрения, при действии НЧ Cu – 3-4, Fe – 6-7 в поле зрения, последнее значение было на уровне контроля. Количество дистрофически измененных опухолевых клеток при введении различных НЧ представлено в таблице 2.

Таблица 2. Сравнительная характеристика дистрофических изменений в клетках саркомы 37 при введении НЧ различных металлов

Группы мышей	Дистрофически измененные клетки, %	Виды дистрофических изменений (%)			
		Кариопикноз	Кариорексис	Кариолизис	Вакуолизация ядра и цитоплазмы
Контроль	13,74±2,3	22,53±1,18	29,41±1,79	29,41±1,79	17,65±1,52
НЧ Zn	71,69±8,74*	16,67±1,5*	29,17±2,02	50,0±6,11*	4,16±0,73*
НЧ Cu	48,2±5,58*	21,43±1,88	28,57±3,37	42,86±3,2*	7,14±1,05*
НЧ Fe	21,66±4,31	17,65±2,22	35,29±4,35	29,41±2,78	17,65±1,32

Примечание: * - статистически достоверные отличия от контроля (P<0,05)

Как видно из таблицы 2, введение НЧ Zn и НЧ Cu вызывает резкое повышение процента дистрофически измененных опухолевых клеток саркомы 37; действие НЧ Zn является более выраженным. Среди отдельных видов дистрофии при действии НЧ Zn преобладает кариолизис, т.е., наиболее грубые повреждения клеток, при этом меньше, чем в других группах, таких изменений, как кариопикноз и вакуолизация. Таким образом, введение НЧ Zn способствует наибольшему повреждению опухолевых клеток асцитной саркомы. Далее по

своему разрушительному действию следуют НЧ Cu, а у НЧ Fe такое действие минимально и статистически недостоверно. Итак, на модели саркомы 37 установлено, что максимальным повреждающим эффектом на асцитную опухоль обладают НЧ Zn, затем НЧ Cu, а наименьшим эффектом – НЧ Fe.

Результаты изучения динамики регрессии опухоли, выживаемости и продолжительности жизни мышей-опухоленосителей с саркомой 180, получавших НЧ металлов, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Влияние введения НЧ металлов на динамику регрессии саркомы 180

Группы мышей	Показатели	Сроки наблюдения (недели после начала введения НЧ)									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Контроль	V (мм ³)	38±1,76	50±18,7	78±29,7	131±37,8	191±83,6	283±128	297±56,1	298	-	
	M±m				**	**	**	**			
	N	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	4/0	1/0	0	
НЧ Zn	V (мм ³)	22±7,1*	11±6,4*	6,2±5,06	8	12,5	8	2	0	0	
	M±m			*							
	N	5/0	5/0	5/0	5/2	5/3	5/4	5/4	5/5	5/5	
НЧ Cu	V (мм ³)	29±8,4	15,6±7,1	7,8±3,96	16±12,9*	14,5±8,2	3,75±2,2**	6	0	0	
	M±m			***	*	*	*				
	N	5/0	5/0	5/0	5/1	5/1	5/1	5/4	5/5	5/5	
НЧ сплава	V (мм ³)	27±6,2	10,8±3,9	6,2±3,96	3,5±1,4*	0,73±0,4	1	0	0	0	
	M±m		6* **	***	**	2***					
	N	5/0	5/0	5/0	5/1	5/2	5/4	5/5	5/5	5/5	

Примечание: * - статистически достоверные отличия от контроля (P<0,05); ** - статистически достоверные отличия от первоначального срока исследования (0); V - объем опухоли; N - число животных (число живых мышей/число мышей с полной регрессией опухоли)

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что у мышей контрольной группы опухоль растет в течение всего срока наблюдения (за 1 мес. ее объем увеличивается в 5,02 раз, а за 7 недель – в 7,8 раз). При этом у животных

опытных групп отмечается ее выраженная регрессия (при введении НЧ Zn объем опухоли за 1 мес. уменьшается в 1,76 раза, НЧ Cu – в 1,8 раза, НЧ сплава НЧ – в 37 раз). Она регистрируется у всех мышей, получавших НЧ, уже через

1 неделю после их начала введения и последовательно продолжается вплоть до полного исчезновения опухоли, несмотря на то, что у разных животных даже в пределах одной группы происходит с неодинаковой скоростью. Первые случаи полной регрессии саркомы 180 обнаружены, начиная с 3-й недели наблюдения (табл. 3). Через 1,5 мес. наблюдения в контрольной группе на фоне роста опухоли начинается падеж мышей, а из животных опытных групп пальпируемые опухоли сохраняются только у 2-х мышей – у одной, получавшей НЧ Zn, и у одной, получавшей НЧ Cu. Все мыши, которым вводили НЧ сплава, к этому времени демонстрируют полную регрессию опухоли (табл. 3). К 8-й неделе наблюдения все контрольные мыши пали, а у всех мышей всех опытных групп регистрируется полная регрессия саркомы 180. Все они живы, активны, без видимых признаков интоксикации. Следует отметить, что введение НЧ закончено на 5-й неделе, а регрессия продолжается вплоть до 7-й, т.е., по-видимому, имеет место кумулятивный эффект или последствие. К 15-й неделе ни у одной из опытных мышей не происходит рецидивирования опухоли; наблюдение продолжается.

Выводы: НЧ металлов проявляют противоопухолевое действие на двух экспериментальных моделях: перевивных мышинных саркомах 37 и 180. Введение взвеси НЧ непосредственно в опухоль вызывает гибель и дистрофические изменения опухолевых клеток, выраженное уменьшение объема асцитной опухоли, особенно демонстративное при действии

НЧ Zn, а также способствует увеличению выживаемости и продолжительности жизни животных-опухоленосителей, приводя к полной регрессии солидной опухоли. В отношении последней все использованные НЧ показывают сходную активность, однако, наибольшая отмечена у НЧ сплава металлов (Cu+Zn+Fe). Высокая эффективность, показанная в эксперименте, и отсутствие видимых признаков интоксикации при применении НЧ металлов позволяет говорить об их перспективности в качестве противоопухолевых препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Мешалкин, Ю.П. Перспективы и проблемы использования неорганических наночастиц в онкологии. / Ю.П. Мешалкин, Н.П. Бгатова // Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2008. – Т. 1, №3 – С. 204-208.
2. Чехун, В.Ф. Нанотехнологии в онкологии: настоящее и будущее. // Онкология. – 2008. – Т.10, №1. – С. 7-8.
3. Кудрин, А.В. Микроэлементы в иммунологии и онкологии / А.В. Кудрин, О.М. Громова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 544 с.
4. Златник, Е.Ю. Цитотоксическое действие наночастиц металлов на опухолевые клетки *in vitro* / Е.Ю. Златник, Г.И. Загора, Л.В. Передреева и др. // «Нанотехнологии в онкологии 2008». Тез. докл. Всеросс. науч. конф. с междунар. участием. – М., 2008. – С. 22.
5. Златник, Е.Ю. Иммуностропное и противоопухолевое действие наночастиц металлов. / Е.Ю. Златник, Г.И. Загора, В.Б. Бородулин, Л.В. Передреева // Росс. аллергол. журнал. – 2009. – Вып. 1, №3. – С. 201.

ANTITUMOR EFFECT OF METALLIC NANOPARTICLES (EXPERIMENTAL STUDY)

©2009 Yu.S. Sidorenko¹, E.Yu. Zlatnik¹, L.V. Peredreeva¹, V.B. Borodulin²

¹Cancer Scientific Research Institute, Rostov-on-Don

²Saratov State Medical University

The experimental study of the effect of metallic nanoparticles (Zn, Cu, Fe and their alloy) on tumor growth in mice was carried out. Two transplanted tumors were studied: ascitic sarcoma 37 and solid sarcoma 180. Nanoparticles (NP) were administrated intratumorally, the total dose was 20 µg per mouse. The control groups were injected with isotonic NaCl. Dynamics of tumor growth, the state of tumor cells, survival and life-span of mice were assessed. We found that NP possess substantial antitumor effect, causing tumor regression up to the complete one, inducing the damage of tumor cells and increase of animals' life-span without any visible signs of toxicity.

Key words: *nanoparticles, metals, antitumor effect*

Yuriy Sidorenko, Academician RAS and RAMS, Director.

E-mail: rnioi@list.ru

Elena Zlatnik, Doctor of Medicine, Professor, Chief Research

Fellow at the Immunology Laboratory

Larisa Peredreeva, Candidate of Biology, Senior Research

Fellow at the Immunology Laboratory

Vladimir Borodulin, Doctor of Biology, Professor, Head of the Biochemistry Department. E-mail: borodulinvb@mail.ru