

О. Г. Резніков¹, Л. І. Полякова¹, О. В. Усатенко²,
Л. В. Чайковська¹, О. В. Сачинська¹

Наночастинки золота виявляють протипухлинну активність у гетеротрансплантатах андрогензалежного раку передміхурової залози людини

¹ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин імені В. П. Комісаренка НАМН України», м. Київ

²Науково-дослідний інститут нанотехнологічної індустрії Відкритого міжнародного університету розвитку людини «Україна», м. Київ

Ключові слова: рак передміхурової залози, наночастинки золота 15 нм, ксенотрансплантат

Пошук нових засобів для лікування такого поширеного захворювання як рак передміхурової залози проводиться в усьому світі, оскільки спостерігається постійний ріст як захворюваності, так і смертності від нього. В останні десятиріччя увагу дослідників привернув новий клас матеріалів з унікальними властивостями, що стали доступними завдяки нанотехнологіям. Можливість формування сталих об'єктів надзвичайно малих розмірів, що можуть мати порожнину у вигляді трубки або сфери, здатних доносити лікарський засіб до місця призначення з найменшими побічними ефектами для всього організму, відразу зацікавила фармацевтів. Кількість експериментальних праць, присвячених медико-біологічному застосуванню наноструктур взагалі та наночастинок металів, зокрема золота, зростає в геометричній прогресії. Наночастинки золота здатні проникати в клітини, а їх накопичення у пухлинних клітинах значно перевищує таке в здорових тканинах навіть тих органів (нирки, печінка), через які відбувається їхнє виведення [1, 2]. Більшість статей з дослідження наночастинок золота присвячена проблемам діагностики, фото- та термотерапії пухлин, з них лише поодинокі стосуються впливу *in vitro* на клітини раку передміхурової залози LnCaP [3]. Продемонстровано

цитотоксичний вплив наночастинок золота *in vitro* щодо клітин аденокарциноми простати людини PC-3 [4].

Відомостей щодо протипухлинної активності наночастинок золота *in vivo* відносно раку передміхурової залози в науковій літературі, включаючи міжнародні бази медичної та біологічної інформації, нами не виявлено.

Мета дослідження – вивчення впливу наночастинок золота на ріст і морфологічну будову гетеротрансплантатів аденокарциноми простати людини в мишей.

Матеріали та методи. Наночастинки колоїдного золота отримували цитратним методом відновлення із золотохлористоводневої кислоти. Наночастинки золота являють собою наносфери розміром 15 нм [5].

Зразки тканин патогістологічно верифікованого раку (аденокарциноми) передміхурової залози взяті для експериментальних досліджень від двох хворих (за інформованою письмовою згодою) під час радикальної простатектомії (операції виконані в Київському областному онкологічному центрі). Хворі не отримували попереднього лікування. Обидві пухлини належали до помірно диференційованих (6 балів по шкалі Глісона).

Зразки вилученої пухлини доставляли в лабораторію в охолоджену середовищі MEM (Serva), що містило сольову суміш Хенкса і буфер HEPES. Пухлинну тканину розсікали на шматочки масою близько 1 мг, які трансплантували під капсулу лівої нирки

самцям мишей (по 2 ксенографти). Дослідження протипухлинної активності нанозолота в дозі 160 мкг/кг проводили на мишах-самцях лінії СВА (маса тіла 20–22 г) нефро-субкапсулярним методом [6] з додержанням біоетичних вимог Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.).

У кожній серії експериментів використовували зразки малігнізованої тканини від одного прооперованого пацієнта. Усього проведено дві серії експериментів на мишах з ксенотрансплантатами, кожна з котрих складалась з трьох експериментальних груп: 1) контроль (уведення розчинника); 2) кастрація мишей перед трансплантацією пухлини (з метою перевірки чутливості пухлини до ендогенних андрогенів) і введення розчинника; 3) введення водно-спиртового розчину нанозолота в дозі 160 мкг/кг; концентрація спирту не перевищувала 9 %.

Кастрацію тварин і трансплантацію їм фрагментів пухлини виконували під хлоралгідратним наркозом.

Розчинник (0,2 мл) або розчин препарату нанозолота (160 мкг/кг маси тіла, sc в об'ємі 0,2 мл) розпочинали вводити мишам після триденного періоду вільного росту ксенотрансплантатів і продовжували протягом наступних 3 днів. Через 24 год після останньої ін'єкції мишей знеживлювали дієтило-

вим ефіром. Вилущені трансплантати зважували на мікроторсійних вагах, фіксували в 4 % розчині параформальдегіду на фосфатному буфері (0,01 М/л, рН 7,4), заливали в парафін і виготовляли серійні зрізи 5 мкм завтовшки. Депарафіновані зрізи фарбували гематоксиліном і еозиною та досліджували за допомогою світлової мікроскопії.

Протипухлинний ефект наночастинок золота, або кастрації оцінювали за ступенем гальмування росту ксенотрансплантатів, порівнюючи величини приросту їхньої маси в експериментальній і контрольній групах, а також за гістологічними ознаками. Достовірність різниці ($P < 0,05$) оцінювали за критерієм t -Стьюдента.

Результати та їх обговорення. У дослідженні використовували андрогензалежні пухлини з однаковим показником індексу Глісона 6 балів. На залежність їх від андрогенів вказувало значне зменшення приросту маси ксенографтів у групі кастрованих тварин (таблиця) і навіть зменшення кінцевої маси відносно початкової в експерименті № 1, що свідчить про регрес пухлини. Приріст маси пухлинних ксенографтів контрольної групи склав в середньому 45 % у першому експерименті та 108 % у другому, що було значно вищим порівняно як з початковою масою ксенографту, так і з групою контролю в експерименті № 1 (таблиця). Ця різниця між двома експеримен-

Таблиця

Вплив наночастинок золота 15 нм у дозі 160 мкг/кг на приріст маси ксенотрансплантатів аденокарциноми простати людини, підсаджених під капсулу нирки мишей лінії СВА ($M \pm m$)

Група тварин	Число ксенографтів	Маса пухлини, мг		Приріст маси, %	
		початкова	кінцева	до початкової	до контролю
Експеримент № 1					
Контроль	8	0,95 ± 0,02	1,38 ± 0,12 ^б	+45,3	100
Кастрація	6	1,10 ± 0,01	1,02 ± 0,05 ^а	-7,3	-18,6
Нано-Au	8	0,95 ± 0,02	0,94 ± 0,07 ^а	-1,05	-2,3
Експеримент № 2					
Контроль	10	1,00 ± 0,01	2,08 ± 0,15 ^б	+108,0	100
Кастрація	6	1,00 ± 0,01	1,30 ± 0,11 ^{ба}	+30,0	27,8
Нано-Au	6	1,00 ± 0,01	1,09 ± 0,05 ^а	+9,0	8,3

Примітка. $P < 0,05$ – вірогідна різниця параметрів відносно: ^аконтролю; ^бпочаткової маси.

тальними групами, ймовірно, пов'язана з індивідуальними особливостями пухлин, які використовували для трансплантації. Вірогідної різниці приросту маси ксенографтів між дослідними групами не виявлено. Результати досліджень свідчать про виражену протиопухлинну активність наночастинок золота розміром 15 нм при парентеральному застосуванні.

У ксенотрансплантатах аденокарциноми простати, підсаджених під капсулу нирки, на 7 день після трансплантації в цілому зберігалась структура первинної пухлини. Гістологічний аналіз показав, що ксенографти через їхні досить малі розміри містили неоднакову кількість епітеліальних утворень, і ступінь збереження в них епітелію також значно відрізнявся. З попередніх наших досліджень видно, що найкраще зберігалися епітеліальні клітини пухлин, що мали дрібноацинарну будову. У таких пухлинах зрідка знаходили поодинокі випадки мітотичного поділу епітеліальних клітин. Низька мітотична активність у досліджуваних пухлинах може бути пов'язана як з низьким ступенем малігнізації пухлин, що належали до повільно зростаючих андрогензалежних помірно диференційованих (індекс Глісона 6), так і з тим, що при зберіганні при +4 °C та підсадці в нове середовище (під капсулу нирки), за умов навіть ослабленої реакції організму реципієнта на трансплантат, цей процес може уповільнюватись.

У ксенографтах, вилучених у тварин контрольної групи, спостерігали виражений набряк строми та перичелюлярний набряк навколо епітеліальних клітин. У периферичній частині ксенографтів знаходили багато лейкоцитів, які нерідко проникали й до центральної їхньої частини, знаходилися між епітеліальними клітинами та виходили в порожнини ациноподібних утворень. Частина епітеліальних клітин мали ущільнені гіперхромні ядра та редуковану цитоплазму, а в частині клітин зберігалися нормохромні ядра нормальної будови (рис. 1). У ксенографтах контрольної групи, підсаджених кастрованим мишам СВА, нормохромні ядра зберігалися в значно меншій кіль-

кості. Це свідчить, що переважна частина клітин аденокарциноми є андрогензалежними.

За введення мишам СВА з ксенографтами колоїдного розчину золота з розміром частинок 15 нм у дозі 160 мкг/кг, перш за все, привертала увагу наявність зон некрозу в стромі та сильний перичелюлярний набряк навколо епітеліальних клітин. У переважній частині епітеліальних клітин ядра були гіперхромні, щільні, часто пікнотичні (рис. 2). Клітини мали вакуолізовану цитоплазму, з'єднувалися з сусідніми лише за допомогою тонких відростків. Нерідко спостерігали відділення фрагментів цитоплазми від клітини або руйнування плазмолемми і некроз. У стромі знаходили залишки зруйнованих клітин, як лейкоцитів, про що свідчила характерно форма ядер, так і стромальних клітин пухлини.

Спостереження за тваринами-реципієнтами показало, що при введенні наночастинок золота в дозі 160 мкг/кг їхня поведінка не порушувалась, вони активно споживали їжу та воду, мали нормальну рухову активність і нормальний стан шерсті. При вилученні ксенографтів нирка, органи черевної порожнини та легені також не мали видимих патологічних змін. Вочевидь, досліджуваний препарат наночастинок золота при парентеральному введенні має низьку загальну токсичність і справляє вплив переважно на пухлинну тканину. Проте це питання потребує додаткового дослідження.

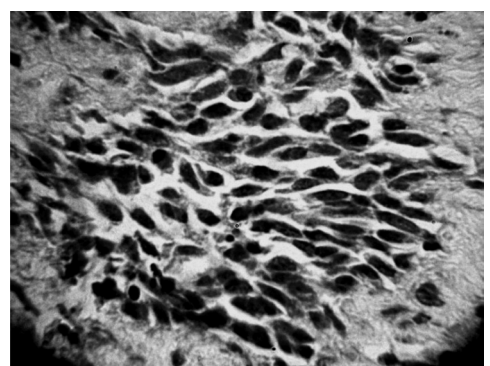


Рис. 1. Мікрофотографія ксенографта аденокарциноми простати людини контрольної групи через 6 діб росту. Гематоксилін-еозин, $\times 400$.

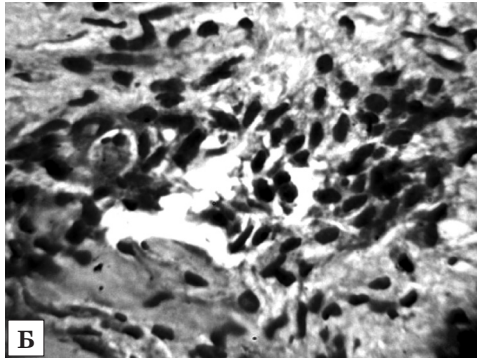
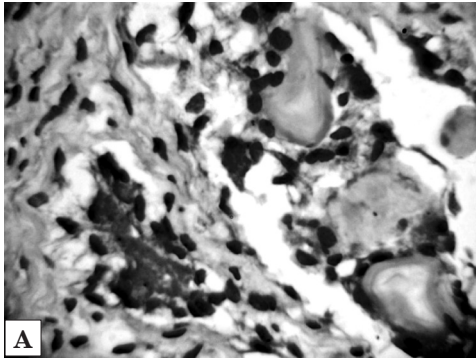


Рис. 2. Мікрофотографія ксенографтів аденокарциноми простати людини під впливом наночастинок золота розміром 15 нм в дозі 160 мкг/кг. А – набряк стромы та перичелюлярний набряк епітеліальних клітин, переважна частина яких має ущільнені гіперхромні ядра; Б – ущільнення і фрагментація цитоплазми епітеліальних клітин. Гематоксилін-еозин, $\times 400$.

Дані літератури свідчать, що після потрапляння в клітину наночастинок золота, залежно від їхнього розміру, мають різну локалізацію [7]. Судячи з даних електронно-мікроскопічного аналізу, можна говорити про переважне накопичення наночастинок золота розміром 10 нм та 20 нм у вакуолях. Для наночастинок золота розміром 30 і 45 нм спостерігається їх переважна акумуляція лізосомами. Золото як метал зазвичай інертне, але наночастинок золота мають високу реакційну здатність та можуть слугувати каталізатором багатьох біохімічних реакцій [8]. Проте відомості щодо біохімічних ефектів впливу наночастинок золота різного розміру на еукаріотичні клітини є досить обмеженими.

Наночастинок золота можуть впливати на ферментні системи. Особливо це стосується мембранозв'язаних ензимів, наприклад Na^+ , K^+ -АТФ-азної та Mg^{2+} -АТФ-азної активності мембранної фракції клітин лінії U937 [9]. Вплив наночастинок золота на Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність мембранної фракції пухлинних клітин лінії U937 може бути зумовлений взаємодією наночастинок певного розміру (як наслідок стеричної відповідності) з SH-групами

молекули ферменту, що відповідають за його конформаційний стан.

Особливої уваги заслуговують результати щодо вивчення особливостей впливу наночастинок золота на генетичний апарат клітини. Є свідчення, що наночастинок золота розміром 10 і 20 нм здатні порушувати структурний стан ДНК клітин лінії U937 [10]. Це зумовлене здатністю наночастинок певного розміру проникати крізь пори ядерної мембрани та безпосередньо взаємодіяти з молекулою ДНК, оскільки середній розмір ядерних пор складає 20–30 нм.

Таким чином, обрані сферичні наночастинок золота розміром 15 нм здатні проникати до пухлини без будь-яких додаткових векторів. Проведені дослідження вказують, що застосування наночастинок золота розміром 15 нм у концентрації 160 мкг/кг гальмує ріст ксенографтів і має виражену цитотоксичність відносно клітин пухлини раку передміхурової залози людини. Морфологічні дослідження свідчать, що в ксенографтах відбуваються деструктивні зміни як епітелію, так і стромы, що веде до появи зон некрозу. Залежність виявлених змін від дози потребує подальших досліджень.

1. Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells / Paino I. M., Marangoni V. S., de Oliveira R. de C. [et al.] // *Toxicol Lett.* – 2012. – V. 215, № 2. – P. 119–125.
2. *In vivo* tumor targeting of gold nanoparticles: effect of particle type and dosing strategy / Puvankrishnan P., Park J., Chatterjee D. [et al.] // *Int J. Nanomedicine.* – 2012. – V. 7. – P. 1251–1258.
3. Gold nano-porcorn-based targeted diagnosis, nanotherapy treatment, and in situ monitoring of photothermal therapy response of prostate cancer cells using surface-enhanced Raman spectroscopy / Lu W., Singh A. K., Khan S. A. [et al.] // *J. Am Chem Soc.* – 2010. – V. 132, № 51. – P. 18103–18114.

-
4. *Arnida, Malugin A.* Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres / Arnida, Malugin A., Ghandehari H. // *J. Appl Toxicol.*– 2010.– V. 30, № 3.– P. 212–217.
 5. Композиція, що містить наночастинки золота, та спосіб її одержання /О. В. Усатенко, О. Б. Щербаків, Н. Ф. Куцевська, Г. В. Повх // Бюл.– 2009.– № 15.– Патент на винахід № 87744.
 6. *Sausville E. A.* Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development / Sausville E. A., Burger A. M. // *Cancer Res.*– 2006.– V. 66.– P. 3351–3354.
 7. Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells /Chithrani B. D., Stewart J., Allen C., Jaffray D. A. // *Nanomedicine.*– 2009.– V. 5, № 2.– P. 118–127.
 8. *Чекман І. С.* Наночастинки: властивості та перспективи застосування / Чекман І. С. // *Укр. біохім. журн.*– 2009.– Т. 81, № 1.– С. 122–129.
 9. Gold nanoparticles synthesis and biological activity estimation *in vitro* and *in vivo* / Rieznicenko L. S., Dybkova S. M., Gruzina T. G. [et al.] // *Exp Oncol.*– 2012.– V. 34, № 1.– P. 25–28.
 10. Аналіз генотоксичності наночастинок золота методом лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин / Дибкова С. М., Резніченко Л. С., Грузіна Т. Г. [та ін.] // *Доповіді НАНУ.*– 2010.– № 3.– С. 166–170.

***A. G. Reznikov, L. I. Polyakova, A. V. Usatenko,
L. V. Chaikovskaya, O. V. Sachynskaya***

Наночастиці золота проявляють протипухольову активність в гетеротрансплантах андрогензависимого рака предстательної залози людини

В краткосрочных экспериментах исследовано влияние сферических наночастиц золота размером 15 нм на рост и гистологическое строение ксенографтов рака предстательной железы человека, трансплантированных под капсулу почки мышей линии СВА. Введение наночастиц золота в дозе 160 мкг/кг массы тела на протяжении 3 суток приводило к торможению роста и вызывало выраженные деструктивные изменения малигнизированного эпителия и стромы в ксенографтах.

Ключевые слова: рак предстательной железы, наночастицы золота 15 нм, ксенотрансплантат

***A. G. Reznikov, L. I. Polyakova, A. V. Usatenko,
L. V. Chaikovskaya, O. V. Sachynskaya***

Gold nanoparticles exhibit antitumor activity in heterotransplants of androgen dependent human prostate cancer

In short-term experiments investigated the effect of spherical gold nanoparticles size of 15 nm on the growth and histology of the human prostate cancer xenografts implanted under the kidney capsule of mice CBA. Animal treatment by gold nanoparticles in the dose of 160 mg / kg b.w./day for 3 days caused growth inhibition and destructive changes of malignant epithelium and stroma in xenograft.

Key words: prostate cancer, gold nanoparticles size of 15 nm, xenograft

Надійшла: 13.06.2013 р.

Контактна особа: Резніков Олександр Григорович, ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин імені В. П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114.
Тел.: + 38 0 432 86 55. Електронна пошта: reznikov39@gmail.com