

УДК 620.3

БИНАРНАЯ ПРОТОННАЯ ТЕРАПИЯ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АДРЕСНЫХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

© 2024 г. М. В. Филимонова^{1,2}, Д. Д. Колманович^{3,4}, Г. В. Тихоновский⁵,
Д. С. Петруня^{4,5,*}, П. А. Котельникова⁶, А. А. Шитова¹, О. В. Солдатова¹,
А. С. Филимонов¹, В. А. Рыбачук¹, А. О. Косаченко¹, К. А. Николаев¹,
Г. А. Демяшкин¹, А. А. Попов⁵, М. С. Савинов⁵, А. Л. Попов^{3,4}, И. В. Зелепукин⁶,
А. А. Липенголец^{5,7}, К. Е. Шпакова^{5,7}, А. В. Кабашинов⁸, С. Н. Корякин^{1,2},
академик РАН С. М. Деев⁶, И. Н. Завестовская^{4,5}

Поступило 25.01.2024 г.

После доработки 15.02.2024 г.

Принято к публикации 20.02.2024 г.

Протонная терапия способна осуществлять лечение опухолей, расположенных в чувствительных к излучению тканях. Данная статья демонстрирует фундаментальную возможность усиления эффекта протонной терапии с использованием адресных наночастиц золота, селективно распознающих опухолевые клетки. Наночастицы Au-PEG в концентрации выше 25 мг/л и дозе протонов 4 Гр вызывали полную гибель клеток ЕМТ6/Р *in vitro*. Также, бинарная протонная терапия с использованием наночастиц золота Au-PEG-FA, векторизованных фолиевой кислотой, вызывала 80% эффект торможения роста опухоли *in vivo*. Использование адресных наночастиц золота является перспективным для усиления протонного воздействия на опухолевые клетки и требует дальнейших исследований для повышения терапевтического индекса подхода.

Ключевые слова: протонная терапия, радиосенсибилизаторы, наночастицы, золото, терапия опухолей

DOI: 10.31857/S2686738924030104, **EDN:** VТОКНА

ВВЕДЕНИЕ

Протонная лучевая терапия является перспективным направлением в радиационной онкологии. Основными преимуществами протонной терапии является высвобождение большей части энергии протонов на конце их пути в пике Брэгга и прямолинейность траектории движения частиц в тканях человека [1]. Это выгодно отличает подход от фотонной лучевой терапии, в которой максимум радиоактивной дозы поглощается в начале пути в ткани. Бинарные подходы к протонной терапии с использованием наночастиц в качестве сенсибилизаторов способны повысить токсические эффекты за счет физических эффектов усиления дозы, а также биологических эффектов образования активных форм кислорода и радикалов [2, 3]. В частности, было показано, что облучение протонами наночастиц из элементов с высоким атомным номером (Z), таких как Au и Pt, вызывает высвобождение вторичных и оже-электронов и образование гидроксил-радикалов в растворе [4]. С другой стороны, даже легкие элементы, такие как бор [5] и титан [6], были способны усилить протонную терапию за счет каталитических процессов, происходящих на поверхности частиц.

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

²Обнинский институт атомной энергетики – филиал ФГАОУ ВО Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск, Россия

³ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

⁴ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, Россия

⁵ФГАОУ ВО Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия

⁶ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

⁷ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

⁸Aix-Marseille University, Марсель, Франция

*e-mail: d.petrunya@lebedev.ru

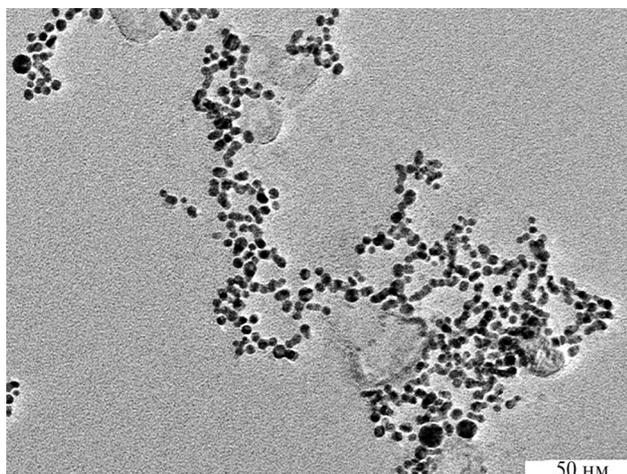


Рис. 1. Изображение наночастиц Au, полученное с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

Тем не менее, доставка наночастиц в опухолевую ткань перед лучевой терапией является самостоятельной сложной задачей. Активно делящиеся опухолевые клетки локализованы в большинстве случаев на периферии опухоли, а также рядом с кровеносными сосудами. В силу этого, внутриопухолевое введение частиц оказывается малоэффективным, так как их диффузия ограничена связыванием с межклеточным матриксом [7]. При использовании внутривенного введения требуется наличие нацеливающих векторов, способных селективно распознавать периферию опухолевой ткани и при связывании длительно задерживать наночастицы в ткани-мишени [8]. Современные работы по созданию нацеленных частиц для протонной терапии ограничены *in vitro* уровнем [9, 10], хотя и демонстрируют высокую селективность осуществляемого воздействия.

Одной из перспективных мишеней для нацеливания является FR α изоформа фолатного рецептора. Данный белок представлен при большом количестве раковых заболеваний эпителиального происхождения, включая рак молочной железы, легких, почек и яичников [11] с уровнем экспрессии 1–10 миллионов белков на клетку, что в 100–300 раз выше, чем у здоровых тканей. В данной работе предложен фундаментальный подход к бинарной протонной терапии с использованием таргетных наночастиц золота, нацеленных на фолатный рецептор с использованием альбумина, конъюгированного с фолиевой кислотой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для демонстрации описанного подхода были получены наночастицы элементного золота методом импульсной лазерной абляции [12] в 1 мМ водно-

го раствора NaCl. При облучении золотой мишени с помощью фемтосекундного Yb: KGW лазера (ТЕТА-10, длина волны 1030 нм, длительность импульса 270 фс, энергия импульса 50 мкДж, частота 200 кГц) образовывались наночастицы с размером менее 100 нм. Для *in vitro* и *in vivo* экспериментов наночастицы с размером менее 20 нм выделялись методом центрифугирования. В результате были получены сферические частицы с размером от 4 до 8 нм, что было подтверждено просвечивающей электронной микроскопией (рис. 1). Полученные наночастицы покрывались полиэтиленгликолем (5 кДа) с концевой тиольной группой за счет образования ковалентной Au-S связи [13], что обеспечивало им долговременную коллоидную стабильность в фосфатно-солевом буфере как минимум в течение 24 часов.

Для оценки возможности усиления протонной терапии с использованием полученных наночастиц цитотоксичность бинарного подхода была изучена на клетках карциномы молочной железы мыши (линия ЕМТ6/Р). Наночастицы золота вносились к клеткам и соинкубировались с ними в течение 16 часов, после чего производилось облучение клеток на комплексе протонной терапии “Прометеус” (Протвино, Россия). Энергия протонов в пучке составила 160.5 МэВ, и монослой клеток располагался в положении распределенного пика Брэгга. Гомогенность пучка составляла не менее 98% при уровне изодозы 95%. Оценка количества колоний с размером более 50 клеток через 8 дней после облучения показала существенное снижение клоногенной активности при бинарной терапии (рис. 2).

Важно отметить, что наночастицы Au-PEG в исследуемом диапазоне концентраций (от 10 до 50 мкг/мл) не вызывали снижение числа образовавшихся колоний клеток, что подтверждает их высокую биосовместимость. В то же время клетки демонстрировали дозозависимый ответ на облучение пучком протонов, что выражалось в снижении количества образующихся колоний на 25 и 50% для доз 2 и 4 Гр соответственно. Преинкубирование клеток с наночастицами Au-PEG в концентрации 50 мкг/мл с совместным облучением в дозе 2 Гр приводило к четырехкратному снижению числа колоний по сравнению с необлученной группой (рис. 2). Также преинкубирование клеток с наночастицами в концентрациях 25 мкг/мл и 50 мкг/мл и облучении в дозе 4 Гр приводило к полному исчезновению раковых колоний. Таким образом, наночастицы Au-PEG проявляли высокую биосовместимость и радиосенсибилизирующее действие при облучении пучком протонов в дозе 2–4 Гр *in vitro*.

Затем радиосенсибилизирующие свойства золота были исследованы *in vivo*. В качестве модели опухоли была выбрана солидная карцинома Эрлиха. Данные клетки гиперэкспрессируют фолатный рецептор

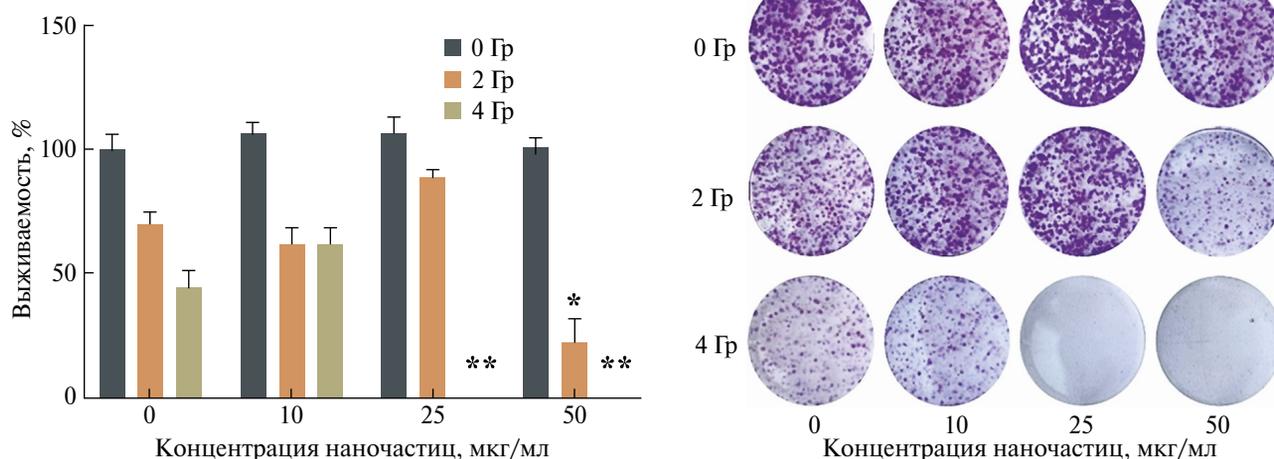


Рис. 2. Клоногенный анализ клеток аденокарциномы ЕМТ6/Р после облучения протонным пучком в присутствии наночастиц Au-PEG. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.001$, тест Стьюдента.

альфа [14], поэтому существовала возможность осуществлять нацеливание внутривенно вводимых наночастиц с помощью таргетного модуля на основе фолиевой кислоты. Для демонстрации данного принципа нами были получены конъюгаты наночастиц Au-PEG с фолиевой кислотой, используя бычий сывороточный альбумин (БСА) в качестве промежуточного линкера (далее – Au-PEG-FA). Конъюгат с БСА получали методом карбодиимидной химии. Присоединение конъюгата к наночастицам было обусловлено образованием связи между SH-группами в альбумине и свободной поверхностью золотых НЧ. Эффективность прикрепления фолиевой кислоты к наночастицам было подтверждено UV-Vis оптической спектроскопией по интенсивности характерного пика поглощения фолиевой кислоты (363 нм) [15].

Клетки карциномы Эрлиха вводились самкам мышей F1 (СВА × С57ВL6j) (возраст 8–10 недель, масса тела 22–24 г) подкожно в область латеральной поверхности правого бедра, и через 10 дней производилось облучение правого бедра протонным пучком с помощью комплекса «Прометеус», доза облучения составила 31 Гр. Для оценки бинарной терапии одной группе мышей за 24 часа до облучения вводили внутривенно в 0.2 мл PBS 20 мг наночастиц Au-PEG-FA с фолиевой кислотой на поверхности. Накопление наночастиц в опухолевом узле оценивали с помощью компьютерной томографии. Критерием наличия наночастиц в определенной области считали повышение рентгеноплотности по сравнению с нативными срезами (в мягкой ткани до введения наночастиц ~110–130 НУ). После внутривенной инъекции наночастиц по данным КТ определялось неомогенное повышение рентгеноплотности ткани опухоли до ~210–240 НУ в виде мелких множественных гипер-

денсивных включений, распределенных неравномерно по всему объему опухоли. Наиболее интенсивное контрастирование отмечалось в перитуморальной строме опухолевого узла, где ожидаемо находится наибольшее количество живых опухолевых клеток. Эти данные могут свидетельствовать об эффективности конъюгата с фолиевой кислотой в качестве опухолеспецифического вектора для солидной карциномы Эрлиха.

Динамику развития карциномы Эрлиха в экспериментальных группах оценивали морфометрически. Для этого через каждые 2–3 дня наблюдения проводили измерение линейных размеров опухолевых узлов у всех животных с помощью цифрового штангенциркуля ШЦЦ-1-125 (НПП ЧИЗ, РФ). Расчет объемов опухолевых узлов и индекса торможения роста опухоли (ТРО) на этапах наблюдения проводили по методике, ранее описанной в работе [16].

Использование наночастиц Au-PEG-FA в качестве радиосенсибилизатора при проведении протонной лучевой терапии значительно усиливало биологический ответ карциномы Эрлиха *in vivo*. При однократном локальном облучении протонами в дозе 31 Гр отмечалось выраженное торможение роста опухоли (ТРО = 55–60%). В то же время предварительное внутривенное введение наночастиц статистически значимо усиливало торможение роста опухоли на 15–25% на протяжении всего периода наблюдений, при этом показатель ТРО достигал 80% (рис. 3). При этом токсического (летального) действия протонной и бинарной терапии в опыте не наблюдалось.

Эффект радиосенсибилизации также был подтвержден сравнительным анализом массы опухолевых узлов, выделенных на терминальном этапе опыта,

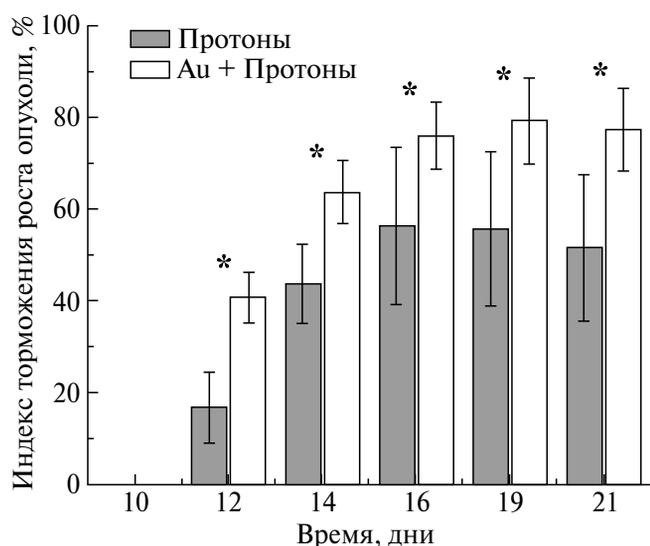


Рис. 3. Показатели индекса торможения роста (ТРО) карциномы Эрлиха после воздействия протонами в дозе 31 Гр в присутствии и отсутствии наночастиц Au-PEG-FA. * – $p < 0.05$, тест Крускала–Уоллиса.

где у мышей после бинарной терапии наблюдалась 2,2-кратно меньшая масса опухоли в сравнении с мышами без терапии и в 1,25 раз меньшая, чем у мышей, получавших только протонную терапию. В данном исследовании была проведена эвтаназия всех животных для терминального макроскопического исследования опухолевых узлов.

Таким образом, в данном исследовании мы показали перспективность использования адресных наночастиц золота, нацеленных на фолатный рецептор опухоли, в качестве сенситизаторов протонной терапии. Наночастицы вызывали полное ингибирование клоногенной активности аденокарциномы ЕМТ6/Р *in vitro* при концентрациях выше 25 мкг/мл и радиодозе 4 Гр. Также, предварительные результаты терапии показали существенное дополнительное замедление роста опухоли при бинарном воздействии наночастиц и протонов. Бинарная терапия с использованием адресных наночастиц золота требует дальнейшего изучения для определения токсичности подхода, детального определения биораспределения частиц и долговременных эффектов лечения опухолей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, № 075-15-2021-1347.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протоколы с использованием животных были одобрены Комиссией по биоэтическому контролю за со-

держанием и использованием лабораторных животных в научных целях ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (номер заявки 1-Н-00053 от 12.09.2023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Durante M., Loeffler J.S. Charged Particles in Radiation Oncology // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010. V. 7(1). P. 37–43. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.183>
2. Lo C.Y., Tsai S.W., Niu H., et al. Gold-nanoparticles-enhanced Production of Reactive Oxygen Species in Cells at Spread-out Bragg Peak under Proton Beam Radiation // *ACS Omega.* 2023. V. 8(20). P. 17922–17931.
3. Martínez-Rovira I., Prezado Y. Evaluation of the Local Dose Enhancement in the Combination of Proton Therapy and Nanoparticles // *Med. Phys.* 2015. V. 42(11). P. 6703–6710.
4. Zwihehoff S., Johnny J., Behrends C., et al. Enhancement of Proton Therapy Efficiency by Noble Metal Nanoparticles is Driven by the Number and Chemical Activity of Surface Atoms // *Small.* 2022. V. 18(9). P. e2106383.
5. Zavestovskaya I.N., Popov A.L., Kolmanovich D.D., et al. Boron Nanoparticle-enhanced Proton Therapy for Cancer Treatment // *Nanomaterials (Basel).* 2023. V. 13(15). P. 2167.
6. Gerken L.R.H., Gogos A., Starsich F.H.L., et al. Catalytic Activity Imperative for Nanoparticle Dose Enhancement in Photon and Proton Therapy // *Nat. Commun.* 2022. V. 13(1). 3248.
7. Zelepukin I.V., Griaznova O.Yu., Shevchenko K.G., et al. Flash Drug Release from Nanoparticles Accumulated in the Targeted Blood Vessels facilitates the Tumour Treatment // *Nat. Commun.* 2022. V. 13(1). 6910.
8. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. Targeted Nuclear Medicine. Seek and Destroy // *Russ. Chem. Rev.* 2022. V. 91(3). RCR5034.
9. Li S., Bouchy S., Penninckx S., Marega R., et al. Antibody-functionalized Gold Nanoparticles as Tumor Targeting Radiosensitizers for Proton Therapy // *Nanomedicine.* 2019. V. 14(3). P. 317–333.
10. Kang S.H., Hong S.P., Kang B.S. Targeting Chemo-proton Therapy on C6 Cell Line Using Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Conjugated with Folate and Paclitaxel // *International Journal of Radiation Biology.* 2018. V. 94(11). P. 1006–1016.
11. Siwowska K., Haller S., Bortoli F., et al. Preclinical Comparison of Albumin-binding Radiofolates: Impact of Linker Entities on the in Vitro and in Vivo Properties // *Mol. Pharm.* 2017. V. 14(2). P. 523–532.
12. Popov A.A., Swiatkowska-Warkocka Z., Marszalek M., et al. Laser-ablative Synthesis of Ultrapure Magneto-plasmonic Core-satellite Nanocomposites for Biomedical Applications // *Nanomaterials (Basel).* 2022. V. 12(4). 649.
13. Gao J., Huang X., Liu H., Zan F., Ren J. Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Modified with Thiol Compounds: Bioconjugation and Application in Cancer Cell Imaging // *Langmuir.* 2012. V. 28(9). P. 4464–4471.
14. R.S., M Joseph M., Sen A., K R.P., Bs U., Tt S. Galactomannan Armed Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as

- a Folate Receptor Targeted Multi-functional Theranostic Agent in the Management of Cancer // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 219. P. 740–753.
15. Baibarac M., Smaranda I., Nila A., Serbschi C. Optical Properties of Folic Acid in Phosphate Buffer Solutions: The Influence of pH and UV Irradiation on the UV–VIS Absorption Spectra and Photoluminescence // *Sci. Rep.* 2019. V. 9(1). 14278.
16. Filimonova M., Shitova A., Soldatova O., et al. Combination of NOS- and PDK-Inhibitory Activity: Possible Way to Enhance Antitumor Effects // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. 730.

BINARY PROTON THERAPY OF EHRlich CARCINOMA USING TARGETED GOLD NANOPARTICLES

M. V. Filimonova^{a,b}, D. D. Kolmanovich^{c,d}, G. V. Tikhonowski^e, D. S. Petrunya^{d,e,#}, P. A. Kotelnikova^f, A. A. Shitova^a, O. V. Soldatova^a, A. S. Filimonov^a, V. A. Rybachuk^a, A. O. Kosachenko^a, K. A. Nikolaev^a, G. A. Demyashkin^a, A. A. Popov^e, M. S. Savinov^e, A. L. Popov^{c,d}, I. V. Zelepukin^f, A. A. Lipengolts^{e,g}, K. E. Shpakova^{e,g}, A. V. Kabashin^h, S. N. Koryakin^{a,b}, Academician of the RAS S. M. Deyev^f, and I. N. Zavestovskaya^{d,e}

^a A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation

^b Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering – Branch of the National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Obninsk, Russian Federation

^c Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

^d P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^e National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russian Federation

^f Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^g Federal State Budgetary Institution N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^h Aix-Marseille University, CNRS, Marseille, France

[#] e-mail: d.petrunya@lebedev.ru

Proton therapy can treat tumors located in radiation-sensitive tissues. This article demonstrates the possibility of enhancing the proton therapy with targeted gold nanoparticles that selectively recognize tumor cells. Au-PEG nanoparticles at concentrations above 25 mg/L and 4 Gy proton dose caused complete death of EMT6/P cells *in vitro*. Binary proton therapy using targeted Au-PEG-FA nanoparticles caused an 80% tumor growth inhibition effect *in vivo*. The use of targeted gold nanoparticles is promising for enhancing the proton irradiation effect on tumor cells and requires further research to increase the therapeutic index of the approach.

Keywords: proton therapy, radiosensitizers, nanoparticles, gold, tumour therapy