

СИНЕРГИЗМ ЦИТОПАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МАРГАНЦА НА РОСТ *in vitro* КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. И. А. Разумов^{1,4,*}, С. Ю. Троицкий², Е. Л. Завьялов^{1,4}, О. И. Соловьева^{1,4}, Б. Г. Гольденберг³, А. А. Легкодымов³, А. Г. Лемзяков³, К. Е. Купер³

¹ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: razumov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 08.09.2020 г.

После доработки 08.09.2020 г.

Принята к публикации 01.10.2020 г.

Исследовано *in vitro* бинарное цитопатическое действие (ЦПД%) синхротронного излучения (СИ) и наночастиц оксида марганца (НЧ MnO) на клеточные линии U87MG, U-251MG и A-172 глиобластом человека. После инкубации клеток с НЧ MnO в концентрации 5 и 50 мкмоль в течение 18–24 ч проводилось облучение клеток глиобластом на источнике СИ ВЭПП-4. Использовались дозы облучения рентгеновскими лучами 0, 1, 2, 4 Гр. Результаты оценивали с помощью световой микроскопии, определения ЦПД% на счетчике (Countess, Invitrogen) и клоногенного теста. Выявлено, что предварительная инкубация клеточных линий глиобластом с НЧ MnO вызывает увеличение ЦПД внешнего СИ в дозе 1, 2 и 4 Гр на клетки глиобластом на 25, 50, 100%. Этот эффект позволяет снизить дозу облучения в 2–3 раза, сохранив эффективность воздействия. При этом период жизнедеятельности опухолевых клеток при совместном воздействии СИ и НЧ сокращается на 18–36 ч. Синергизм комбинации НЧ MnO и СИ, вероятно, предоставит новые возможности для разработки модели лечения опухолей головного мозга.

DOI: 10.1134/S1992722320060163

ВВЕДЕНИЕ

Радиотерапия является необходимым общепринятым методом лечения онкологических заболеваний, хотя избыточное радиационное воздействие остается пагубным для людей. В случае глиобластомы — злокачественной агрессивной опухоли головного мозга — применяется адъювантная радиохимиотерапия [1, 2]. Однако эффективность существующей схемы лечения остается недостаточной, а заболевание — неизлечимым [3, 4]. При этом стоимость лечения опухолей головного мозга имеет самые высокие значения по сравнению с расходами на медицинскую помощь при любой другой опухоли [5]. Насущная необходимость разработки и внедрения новых диагностических подходов и препаратов для лечения глиом не вызывает сомнения.

Методы лучевой терапии [6, 7] получили существенный импульс к развитию благодаря созданию источников высокоэнергетического излучения, а также разработке инструментов, обеспечивающих точную локализацию и строгое

дозирование времени радиотерапевтического воздействия. Кроме того, активно развивается такое направление оптимизации лучевых методов, как разработка способов искусственного управления радиочувствительностью здоровых и опухолевых тканей с помощью различных модифицирующих агентов избирательного действия [8], и наибольшей эффективности радиотерапия пока достигает при ее сочетании с химиотерапией [9].

Вместе с тем аналогичные результаты были показаны при применении лучевой терапии на фоне введения наночастиц (НЧ) оксида золота или серебра в культуру опухолевых клеток U251 и в мышей в модели ортотопической ксенотрансплантации [10–12]. Причем наибольшей эффективности и увеличения сроков жизни животных удалось достичь при сочетании облучения и введения НЧ Ag. Однако негативные эффекты высоких доз облучения остаются актуальными.

В последнее время нанотехнологии рассматриваются в качестве нового инструмента для при-

менения в диагностике и лечении злокачественных опухолей благодаря способности раковых клеток активно захватывать и накапливать НЧ [13]. Наночастицы также используются в разработке новых подходов по адресной доставке лекарственных средств в опухолевые клетки, что может служить платформой для разработки новых вариантов тераностики и комбинированной терапии с последующим мониторингом заболевания [14]. Большой интерес представляют частицы оксидов марганца, НЧ которых и их конъюгаты могут быть использованы в качестве контрастных агентов для обнаружения и диагностики опухолей, а также доставки и распределения препаратов в организме и опухолях и улучшенной *in vivo* химиотерапии опухолей [15, 16].

В [17] были получены предварительные данные по использованию синхротронного излучения (СИ) против линии клеток U-87MG в сочетании с насыщением этих клеток НЧ MnO. Эти НЧ использовались в магнитно-резонансной томографии при визуализации ксенографтов-U-87MG у иммунодефицитных животных [18]. Согласно [19] НЧ MnO обладают высокой избирательной цитотоксичностью против клеток глиобластом *in vitro*. Исходя из анализа результатов предполагаем, что такая комбинация НЧ и СИ может вызвать синергический эффект, основанный на образовании активных радикалов при введении НЧ MnO, чей окислительный эффект будет усилен СИ в малых дозах. Наличие такого эффекта, вероятно, позволит снизить дозу облучения для уничтожения опухолевых клеток.

В связи с этим цель данной работы – изучение *in vitro* совместных цитотоксических эффектов воздействия СИ и НЧ MnO на клеточные линии глиобластом человека U87MG, U-251MG и A-172.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии глиобластомы человека, U87MG (АТСС НТВ 14), U-251MG, A-172 (КККП, Санкт-Петербург), и диплоидный штамм ФЭЧ-15 (ККК ГНЦВБ Вектор), которые поддерживались и хранились в криобанке ЦКП “SPF-виварий” ИЦиГ СО РАН, размораживали и культивировали в течение 5–7 пассажей на среде DMEM\F12 с 10%-ной фетальной сывороткой (FBS) фирмы “Invitrogen”.

Синтез НЧ MnO и определение концентрации моноядерных соединений Mn^{2+} в растворе. Наночастицы MnO (ФИЦ “Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН”) синтезировали методом гидролиза солей марганца путем медленного добавления в водный раствор $MnSO_4$ (0.5 М) раствора NaOH (1 М) при температуре 20°C и энергичном перемешивании на магнитной мешалке. Вливание щелочи прекращали при достижении значе-

ния pH = 8.4 и сохранении этого значения в течение 5 мин при отклонениях pH не более 0.1. Конечная концентрация соединений марганца(II) в водной суспензии НЧ MnO составляла 0.4 М. Измерение концентрации соединений марганца проводили методом атомной эмиссионной спектроскопии на приборе Optima 4300 DV (Perkin Elmer). Анализ содержания моноядерных соединений Mn^{2+} проводили после отделения суспензии НЧ MnO от раствора центрифугированием с последующим разбавлением аликвоты маточного раствора разбавленной серной кислотой.

Определение размеров НЧ MnO методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Для получения данных МУРР использовали дифрактометр S3 MICRO (HECUS) с точечной коллимацией и медным излучением (CuK_{α} , 50W). Измерения рентгенограмм проводили в интервале векторов q от 0.01 до 0.6 \AA^{-1} , где $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$. Для обработки экспериментальных данных и распределения частиц по размерам применяли пакет программ ATSAS [20], где использовали описание малоугловых данных набором полидисперсных сфер.

Наночастицы. В работе использовали и коммерческие препараты, НЧ SiO_2 (как отрицательный контроль на токсичность НЧ) и НЧ Mn_2O_3 (US Research Nanomaterials, Inc), а также раствор хлорида марганца $MnCl_2$ (Sigma-Aldrich) как источник ионов Mn^{2+} и позитивный контроль на токсичность.

Облучение клеток с использованием СИ. Экспозицию клеток проводили на станции “Фазово-контрастной рентгеновской микроскопии и томографии”, использующей СИ из семиполусного вигглера, установленного на ускорителе заряженных частиц ВЭПП-4М (ИЯФ СО РАН, Новосибирск) [21]. Для измерения поглощенной дозы в исследуемых клетках использовали рентгеночувствительную пленку GAFCHROMIC HD-810. Калибровочная кривая для прозрачности дозиметрической пленки GAFCHROMIC HD-810 при СИ приведена в [17]. Для привязки полученных результатов к абсолютным значениям интенсивности СИ использовали колориметр полного внутреннего поглощения, позволяющий измерять мощность рентгеновского излучения с точностью не хуже 1% [22].

Определение цитопатического действия (ЦПД) синхротронного облучения и НЧ MnO на культуры клеток. Изучение цитотоксической активности проводили, руководствуясь данными [23]. Для определения цитотоксических эффектов в ростовую среду культур клеток вносили пробы НЧ в соответствующих разведениях, используя среду DMEM\F12 в качестве разбавителя. Клетки культивировали с НЧ в течение 18–24 ч при 37°C. Определение ЦПД% различных факторов на клетки проводили через 1, 18, 36, 54, 72, 90 и 108 ч

после воздействий. ЦПД оценивали в результате визуального осмотра с использованием светового микроскопа Zeiss Primo Vert и подсчета доли погибших клеток на счетчике (Countess, Invitrogen), согласно инструкции производителя, после чего вычисляли среднее значение. При достижении ЦПД в контрольных образцах (без воздействия НЧ и облучения) больше 15% эксперимент прекращали.

Клоногенный тест. После облучения клетки отмывали буфером, снимали трипсином и высевали по 200 клеток в четыре ряда 96-луночного планшета (шесть клеток в лунку) в трех повторах. Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе и контролировали состояние и количество клеток в колониях. На 21-е сутки, когда колонии достигали достаточного размера (не менее 50 клеток), их фиксировали 10%-ным формалином (Panreac AppliChem, Германия) и окрашивали раствором Гимза (Sigma, США) [24]. Эффективность клонирования клеток в контрольной группе принимали за 100%. В экспериментальных группах эффективность клонирования определяли как процент от клонирования в контрольной группе. Подсчет проводили при помощи светового инвертированного микроскопа Zeiss Primo Vert (Германия). В связи с низкой эффективностью клонирования клеток А-172 провести клоногенный тест для этой линии было невозможно.

Статистический анализ. Разницу между опытными группами проводили с использованием непараметрических методов анализа данных в программе STATISTICA 10 StatSoft Inc.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Свойства используемого препарата НЧ MnO. Оценку содержания ионов Mn²⁺ в препарате НЧ MnO, используемом в работе, проводили методом атомной эмиссионной спектроскопии. В результате было обнаружено, что раствор содержит свободные моноядерные соединения Mn в концентрации менее 2×10^{-4} М, т.е. в следовых количествах, недостаточных для проявления токсического эффекта.

Размеры НЧ играют значительную роль в проявлении биологических эффектов. Результаты анализа спектра МУРР суспензии НЧ MnO представлены на рис. 1. Как видно на рисунке, наибольшее количество НЧ имело диаметр ~8–10 нм (8 ± 3 нм). Второй максимум в распределении НЧ наблюдался в районе 30 нм, что соответствует агрегированным частицам, в которых одна НЧ диаметром около 10 нм окружена, по-видимому, слоем таких же частиц, как наблюдалось в полиядерных комплексах Pd(II) [25]. При этом максимальный размер таких комплексов из НЧ MnO_x не превышал 38 нм.

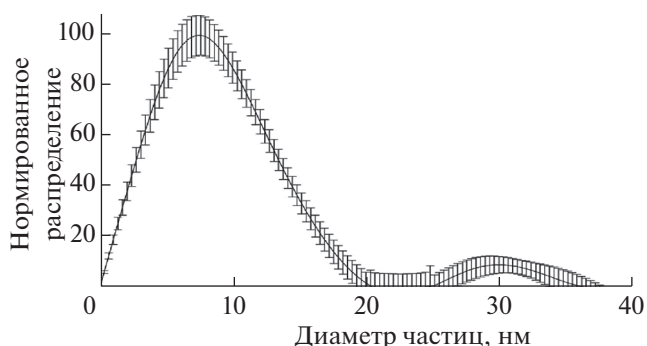


Рис. 1. Определение методом МУРР распределения частиц MnO_x по размерам в дистиллированной воде.

Определение ЦПД на клетки глиобластомы U87MG под воздействием СИ. На первом этапе клетки глиобластомы U87MG облучали без обработки НЧ при дозах СИ от 1 до 160 Гр, результаты представлены на рис. 2. Цитопатические эффекты в группе клеток с поглощенной дозой 160 Гр наблюдались практически сразу. Так, в первый час после СИ было выявлено ЦПД 25% ($\chi^2 = 12.36, p < 0.001$), далее через 36 ч обнаружено ЦПД 50% ($\chi^2 = 45.85, p < 0.001$) и ЦПД 100% ($\chi^2 = 169.70, p < 0.001$) через 72 ч после облучения. При поглощенной дозе 40 Гр через 72 ч обнаружено ЦПД 25% ($\chi^2 = 12.36, p < 0.001$) и ЦПД 50% ($\chi^2 = 32.00, p < 0.001$) через 90 ч после облучения. Для СИ в дозе 4 Гр цитопатические эффекты имели следующую динамику: ЦПД 15% ($\chi^2 = 3.40, p = 0.064$) через 72 ч и ЦПД 25% через 90 ч ($\chi^2 = 4.77, p = 0.028$). При дозе 1 Гр цитопатические эффекты облучения и скорость гибели клеток глиобластомы U87 практически не отличались от контроля без облучения в течение периода наблюдения.

Оценка ЦПД препарата НЧ MnO на клетки U87MG. Первоначально проводили оценку токсичности препарата НЧ MnO на клетки U-87MG. Как видно на рис. 3, при оценке роста опухолевых клеток U-87MG *in vitro* было обнаружено ЦПД 100% ($\chi^2 = 173.25, p < 0.001$) через 18 ч при наличии в ростовой среде 500 мкмоль НЧ MnO, а при дозе НЧ 50 мкмоль выявлено ЦПД 85% ($\chi^2 = 98.00, p < 0.001$) через 90 ч культивирования после добавления НЧ. В момент закрытия эксперимента, через 108 ч, количество погибших клеток составило ЦПД 100% ($\chi^2 = 140.53, p < 0.001$) при дозе 50 мкмоль, ЦПД 50% ($\chi^2 = 26.34, p < 0.001$) при дозе 5 мкмоль и ЦПД 15% в контроле без облучения. Исходя из полученных результатов, дозы 5 и 50 мкмоль НЧ MnO можно обозначить как НЧ-ЛД 50% и НЧ-ЛД 100%, т.е. летальные дозы, вызывающие соответственно гибель 50 и 100% клеток через 108 ч после введения в ростовую среду клеточной линии U-87MG.

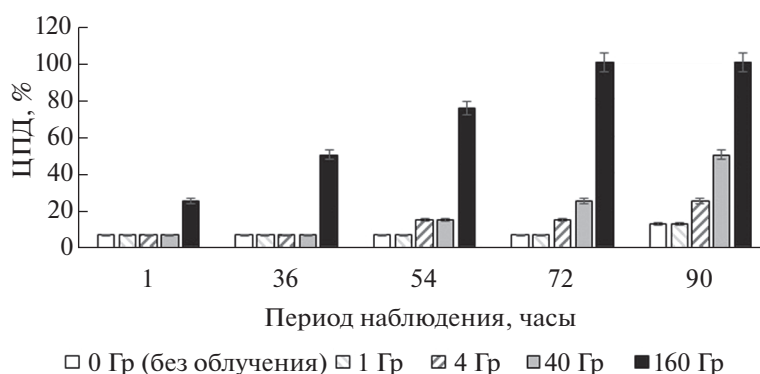


Рис. 2. Определение ЦПД разных доз СИ на клетки глиобластомы U87MG.

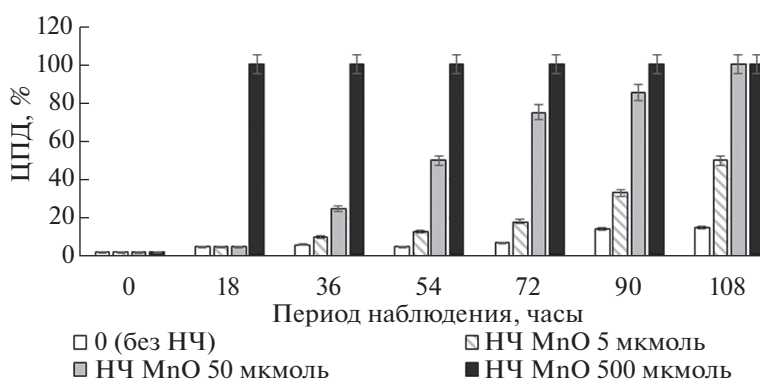


Рис. 3. Определение ЦПД на клетки U87MG при добавлении НЧ MnO в ростовую среду.

Определение ЦПД на клетки глиобластомы U-87MG и нетрансформированные клетки ФЭЧ-15 при низких дозах СИ с применением НЧ. Так как синергизм наиболее полно выражается при комбинации веществ в малых дозах, а также при низких дозах облучения, СИ использовали в дозах 1, 2 и 4 Гр, чтобы более наглядно выявить наличие или отсутствие этого эффекта. Исследование совместных эффектов НЧ и доз облучения 1, 2 и 4 Гр на рост U-87MG показано на рис. 4. Так, было выявлено, что при дозе 4 Гр (рис. 4б) и концентрации НЧ MnO 50 мкмоль (НЧ-ЛД 100%) цитопатические эффекты достигали для U-87MG ЦПД 100% ($\chi^2 = 60.63, p < 0.001$) через 72 ч, когда в контроле без СИ наблюдали ЦПД 50%. При дозе СИ 1 и 2 Гр выявлено ЦПД 100% ($\chi^2 = 23.38, p < 0.001$) опухолевых клеток через 90 ч, когда в контроле без СИ наблюдали ЦПД 75%.

При уменьшении концентрации НЧ MnO до 5 мкмоль (НЧ-ЛД 50%) цитопатические эффекты совместного действия были выражены более наглядно. Так, при дозе 4 Гр и 5 мкмоль НЧ MnO (НЧ-ЛД 50%) наступало ЦПД 100% ($\chi^2 = 60.63, p < 0.001$) через 90 ч (в контроле без СИ ЦПД 50%). А при дозе 2 Гр и 5 мкмоль НЧ MnO наблю-

дали ЦПД 75% ($\chi^2 = 12.28, p < 0.001$) через 90 ч (в контроле без СИ ЦПД 50%). При дозе 1 Гр и 5 мкмоль НЧ MnO через 108 ч также была выявлена разница в эффектах: ЦПД 75% ($\chi^2 = 4.46, p = 0.034$) при совместном воздействии и в контроле без СИ ЦПД 60%.

При выявлении совместных эффектов НЧ и облучения (при дозах 2 и 4 Гр) на клетки с нормальным генотипом ФЭЧ-15 (рис. 5) обнаружено, что НЧ MnO в концентрации 50 мкмоль не оказывали выраженного токсического действия на эти клетки. В результате при дозах облучения 2 и 4 Гр* и при совместных воздействиях НЧ и облучения скорость или динамика гибели клеток ФЭЧ-15 практически не отличались от контроля. Кроме того, при проведении подобных экспериментов с применением коммерческих НЧ Mn₂O₃ (100 мкмоль), НЧ SiO₂ (1000 мкмоль) и раствора солей MnCl₂ (500 мкмоль) в дозах, превышающих используемые концентрации НЧ MnO, эффекта усиления ЦПД при облучении U87 клеток не обнаружено.

Итак, в опытах *in vitro* установлено отсутствие цитотоксического воздействия изученных НЧ MnO на нормальные клетки человека ФЭЧ-15

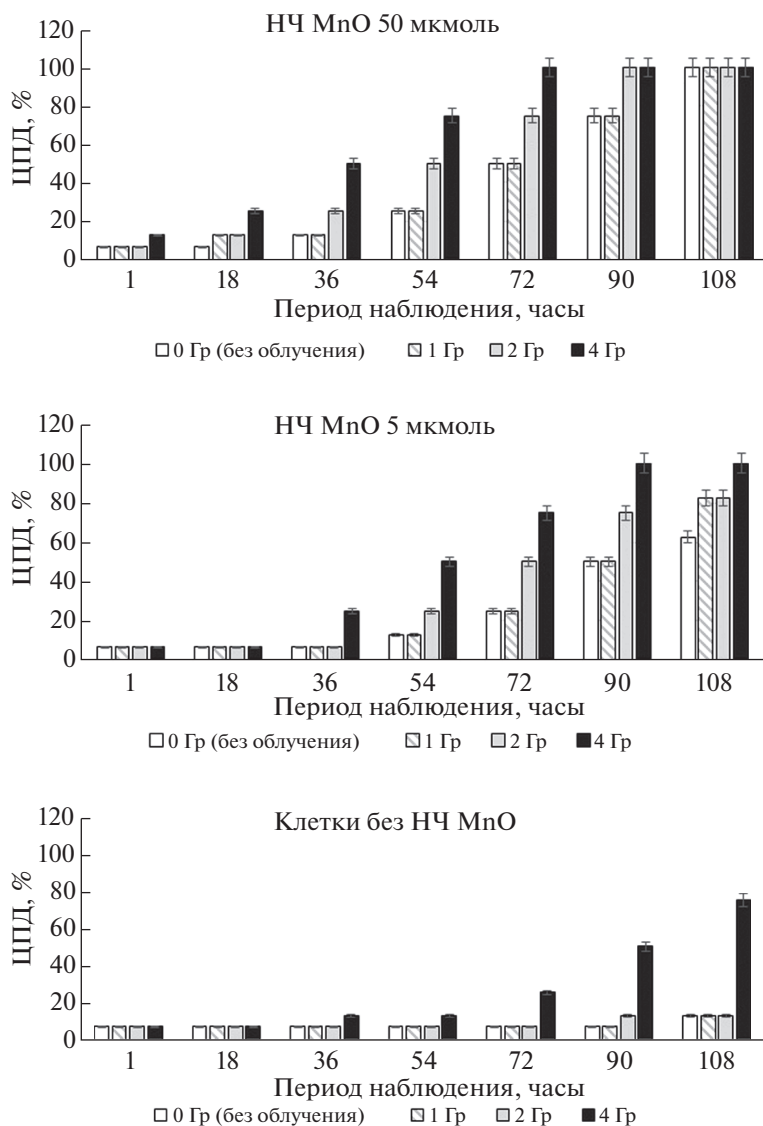


Рис. 4. Определение совместного ЦПД на опухолевые клетки U87MG низких доз СИ и инкубации клеток с НЧ MnO в дозах 5 и 50 мкмоль.

при введении в среду для культивирования 50 мкмоль (ЛД100% для клеток U-87) этих НЧ. Данный факт позволяет надеяться на минимальный цитотоксический эффект НЧ MnO на нормальные или нетрансформированные клетки.

Определение ЦПД при совместном действии НЧ MnO и СИ на клетки U-87, A-172 и U-251 глиобластом человека. В последующих экспериментах спектр облучаемых культур клеток расширили и использовали клетки трех глиобластом человека U-87, A-172 и U-251. Кроме того, несколько изменили процесс определения цитолиза клеток при инкубации с НЧ и последующего облучения синхротроном. После предварительной инкубации клеток с НЧ MnO в течение 18–24 ч до облучения удаляли среду с НЧ, проводили однократную

промывку клеток раствором Дульбекко и добавляли свежую ростовую среду (содержание сыворотки 5%) без НЧ. Как видно из полученных данных (рис. 6), на клетках всех трех линий глиобластом, U-87, A-172 и U-251, выявлен эффект усиления воздействия на цитолиз опухолевых клеток СИ при предварительном добавлении в среду НЧ MnO. Вместе с тем выявлены некоторые особенности цитолиза (относительно U-87) клеток глиобластом A-172 и U-251 при совместном воздействии СИ и НЧ. Так, для клеток A-172 выявлен ускоренный эффект совместного воздействия НЧ MnO (50 мкмоль) и дозы СИ 4 Гр, когда ЦПД 100% ($\chi_2 = 149.73, p < 0.001$) клеток было обнаружено через 72 ч, тогда как отдельные эффекты НЧ MnO (50 мкмоль) и дозы СИ 4 Гр

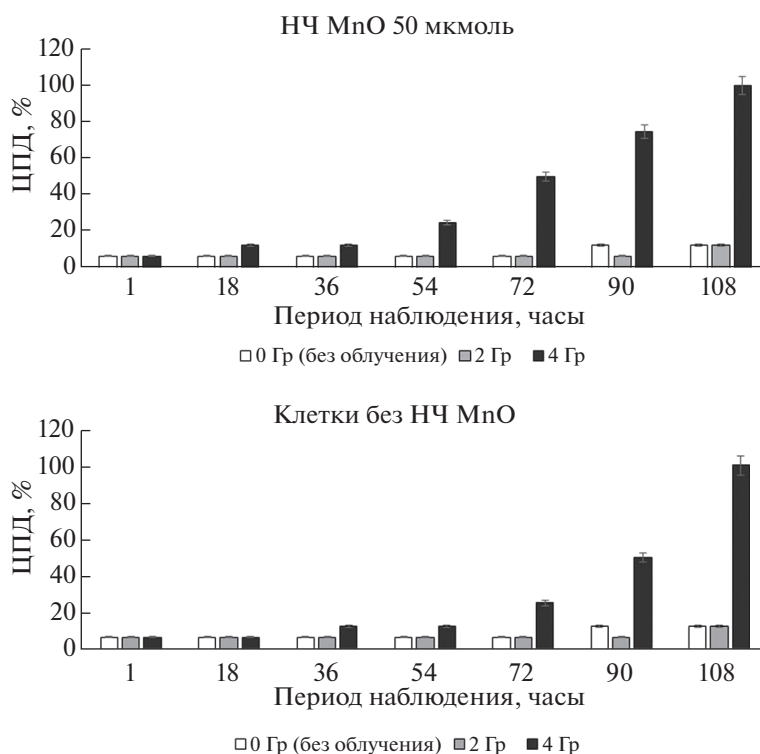


Рис. 5. Определение ЦПД на нормальные клетки ФЭЧ-15 при дозах облучения 2 и 4 Гр и инкубации клеток с НЧ MnO в дозе 50 мкмоль.

оказали ЦПД 50% ($\chi^2 = 32.00, p < 0.001$) на клетки. Для клеток U-251 также была выявлена повышенная чувствительность к совместному воздействию. Так, после инкубации с НЧ и СИ (НЧ+, СИ+) в той же дозе эффект ЦПД 100% ($\chi^2 = 149.73, p < 0.001$) был обнаружен через 90 ч, тогда как эффект СИ 4 Гр в пробе (СИ+, НЧ-) ЦПД составил приблизительно 50% ($\chi^2 = 32.00, p < 0.001$), а при воздействии НЧ MnO (50 мкмоль) ЦПД составило 37% ($\chi^2 = 15.56, p < 0.001$) за этот период.

По-видимому, имеет место усиленный цитотоксический эффект на клетки глиом U-87, A-172 и U-251, вызванный совместным воздействием СИ и предварительного введения НЧ MnO в ростовую среду.

Клоногенный тест позволяет определять жизнеспособность и репродуктивную функцию клеток спустя продолжительное время (10–21 день) после воздействия на клетки [24]. Результаты (рис. 7), полученные методом клонирования в течение трех недель, показали, что оба исследуемых воздействия, СИ и НЧ MnO, раздельно оказывали значительное влияние на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток глиобластом U87 и U251 (рис. 7). Так, после облучения клеток глиобластомы U87, поглощенная доза СИ для которых была равна 4, 2 и 1 Гр, доля выжив-

ших клеток через 21 сутки после облучения составила 12.2% ($\chi^2 = 149.73, p < 0.001$), 49.0% ($\chi^2 = 62.39, p < 0.001$) и 85.7% ($\chi^2 = 11.48, p < 0.001$) (рис. 7) соответственно. Определение клоногенной активности клеток U-251 после обработки СИ в дозе 4 Гр выявило 14.5% ($\chi^2 = 39.25, p < 0.001$) выживших опухолевых клеток, образующих колонии. Введение в ростовую среду клеток U-87 наночастиц MnO в дозе 50 и 5 мкмоль также не вызвало 100%-ной гибели клеток, доля пролиферирующих клеток U87 составила 4.1% ($\chi^2 = 176.87, p < 0.001$) и 18.4% ($\chi^2 = 131.80, p < 0.001$) соответственно.

Вместе с тем в результате совместного воздействия при облучении клеток U87 дозой 4 Гр доля выживших клеток, предварительно проинкубированных с НЧ MnO 50 и 5 мкмоль в среде, снизилась более чем в 4 и 3 раза (относительно воздействия НЧ MnO) соответственно. Относительно результатов воздействия СИ доля выживших клеток уменьшилась более чем в 12 и 6 раз и составила 0% ($\chi^2 = 8.22, p = 0.004$) и 2% ($\chi^2 = 6.22, p = 0.012$).

Аналогичная ситуация наблюдалась при облучении (СИ 4 Гр) клеток U251, которые также предварительно инкубировались с НЧ MnO 50 мкмоль в среде, доля выживших клеток снизилась более чем в 6.5 раза и составила 0% ($\chi^2 = 2.36,$

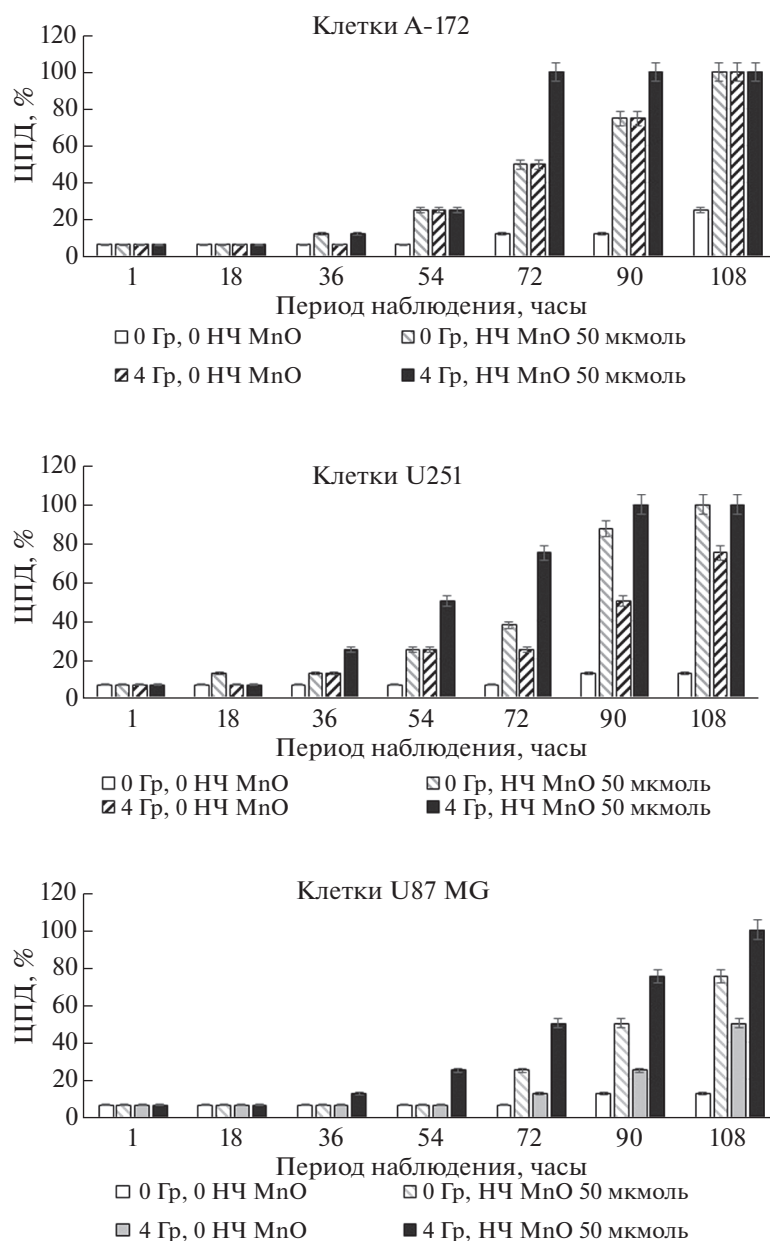


Рис. 6. Определение суммарного влияния облучения и предварительной инкубации клеток с НЧ MnO на цитотоксичность опухолевых клеток глиом U-87, A-172 и U-251.

$p = 0.123$) относительно воздействия НЧ MnO и в 14.5 раза и составила 0% ($\chi^2 = 10.37$, $p = 0.001$) относительно СИ.

Итак, в результате совместного воздействия на эти клетки СИ в дозе 4 Гр и наночастиц в дозе 50 мкмоль выявлена 100%-ная летальность клеток U-87 ($\chi^2 = 8.22$, $p = 0.004$) и U-251 ($\chi^2 = 9.27$, $p = 0.001$). Полученные данные клоногенного теста также указывают, что совместное влияние СИ и НЧ MnO вызывает эффект синергизма (усиления) цитотоксического воздействия на клеточные линии глиом головного мозга человека.

Отметим, что онкогенез мозга, в частности, при развитии глиом, как правило, связывают с окислительным стрессом, который отражается в дисбалансе между продукцией свободных радикалов и антиоксидантными механизмами. Когда существующее равновесие окислителей и антиоксидантов в опухолевой клетке нарушается, свободные радикалы запускают перекисное окисление липидов клеточных мембран, окисление белков и ДНК, что вызывает цитотоксичность клеток [26]. Исходя из этого, предполагаем, что НЧ MnO запускают окислительный стресс, а СИ даже при малых дозах 1–2 Гр вызывает полный

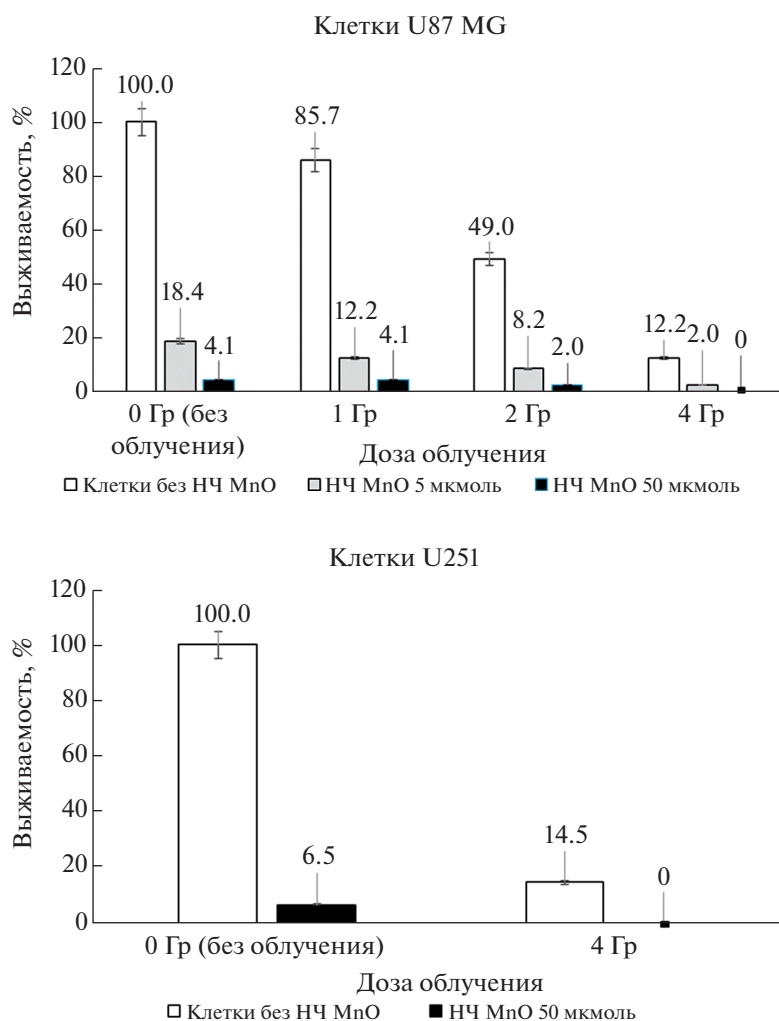


Рис. 7. Определение методом клонирования влияния минимальных доз облучения и предварительной инкубации клеток с НЧ MnO на выживаемость опухолевых клеток глиом U-87 (а) и U-251 (б).

дисбаланс между продукцией свободных радикалов и антиоксидантными механизмами, что усиливает различные патологические реакции в опухолевых клетках и при некоторых условиях вызывает 100%-ную летальность. Вероятно, выявленный эффект синергизма позволит воздействовать на опухолевые стволовые клетки и добиться 100%-ной летальности этих клеток. В популяции опухоли они представлены 2–10% клеток, считаются устойчивыми к облучению и химиотерапии и являются источником рецидивов [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На клетках всех трех линий глиобластом, U-87, A-172 и U-251, выявлен эффект усиления воздействия на цитотоксический эффект СИ при предварительном добавлении в среду НЧ MnO. Эффект усиления или синергизма совместного воздействия выражался в более раннем выявлении

50 или 100%-ного ЦПД на опухолевые клетки или обнаружении такого цитолитического эффекта при более низких дозах СИ. Так, в ходе работы было выявлено, что при низких дозах (1–2 Гр) облучения клеток глиом U-87, A-172 и U-251, предварительно культивируемых 18–24 ч с НЧ MnO, эффект ЦПД был на 25–100% больше и проявлялся на 18–36 ч раньше. Данный суммарный эффект, по-видимому, подтверждает, что, используя предварительную инкубацию клеточных линий глиобластом с цитотоксическими НЧ MnO, можно снизить дозу облучения с 4 Гр до 1–2 Гр при том же эффекте ЦПД на опухолевые клетки глиом. Отметим, что выявленный *in vitro* высокий уровень цитотоксического воздействия на клетки злокачественных опухолей головного мозга человека совместного действия СИ и введения НЧ MnO указывает на перспективность использования полученных данных для разработки нового комбинированного подхода для противоопухолевой терапии глиом

человека. Для выяснения всех возникающих вопросов необходимы дальнейшие исследования. Разработка и оценка выявленного эффекта на модели подкожной и ортотопической ксенотрансплантации клеток глиобластом человека иммунодефицитным SCID мышам будут продолжены.

Исследования выполнены при поддержке Минобрнауки РФ (проект № 0324-2019-0041, уникальный идентификатор проекта RFMEF162119X0023) с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Исследования НЧ MnO выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Национальный центр исследования катализаторов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Frosina G.* // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2015. V. 96. № 2. P. 257.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.05.013>
2. *Young R.M., Jamshidi A., Davis G., Sherman J.H.* // Ann. Transl. Med. 2015 V. 9. P. 121.
<https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10>
3. *Ostrom Q.T., Gittleman H., Liao P. et al.* // Neuro Oncol. 2014. V. 16. P. 1.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/nou223>
4. *Ostrom Q.T., Gittleman H., Truitt G. et al.* // Neuro Oncol. 2018. V. 20. P. 1.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>
5. *Mariotto A.B., Yabroff K.R., Shao Y. et al.* // J. Natl. Cancer. Inst. 2011. V. 103. № 2. P. 117.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djq495>
6. *Noda S.E., El-Jawahri A., Patel D. et al.* // Semin. Radiat. Oncol. 2009. V. 19. № 3. P. 171.
<https://doi.org/10.4103/0971-5851.103142>
7. *Khan L., Soliman H., Sahgal A. et al.* // Cochrane Database Syst. Rev. 2016. V. 19. № 8. P. 1.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD011475.pub2>
8. *Calugaru V., Magné N., Héroult J. et al.* // Bull. Cancer. 2015. V. 102. № 1. P. 83.
<https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2014.10.002>
9. *Stepanovic A., Nikitovic M.* // J. BUON. 2018. V. 23. № 1. P. 7.
10. *Yamada M., Foote M., Prow T.W.* // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2015. V. 7. № 3. P. 428.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1322>
11. *Liu P., Jin H., Guo Z. et al.* // Int. J. Nanomed. 2016. V. 11. P. 5003.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S115473>
12. *Wu H., Lin J., Liu P. et al.* // Biomaterials. 2016. V. 101. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.031>
13. *Raliya R., Singh C.T., Haddad K., Biswas P.* // Curr. Pharm. Des. 2016. V. 22. № 17. P. 2481.
<https://doi.org/10.2174/1381612822666160307151409>
14. *Aftab S., Shaha A., Nadhman A. et al.* // Int. J. Pharm. 2018. V. 540. P. 132.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.007>
15. *Ozada C., Tekin V., Barlas F.B. et al.* // Chemistry Select. 2020. V. 5. P. 1987.
<https://doi.org/10.1002/slct.201901620>
16. *Cai X., Zhu Q., Zeng Y. et al.* // Int. J. Nanomed. 2019. V. 14. P. 8321.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S218085>
17. *Kuper K.E., Zavjalov E.L., Razumov I.A. et al.* // Physics Procedia. 2016. V. 84. P. 252.
<https://doi.org/10.1016/j.phpro.2016.11.043>
18. *Завьялов Е.Л., Разумов И.А., Герлинская Л.А., Ромащенко А.В.* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т. 19. № 4. С. 77.
<https://doi.org/10.18699/VJ15.061>
19. *Разумов И.А., Завьялов Е.Л., Троицкий С.Ю. и др.* // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2017. № 2. С. 114.
<https://doi.org/10.1007/s10517-017-3849-0>
20. *Petoukhov M.V., Konarev P.V., Kikhneya A.G., Svergun D.I.* // J. Appl. Cryst. 2007. V. 40. P. 223.
<https://doi.org/10.1107/S0021889807002853>
21. *Baranov G., Borin V., Zhuravlev A. et al.* // J. Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. 2020. V. 14. P. 150.
<https://doi.org/10.1134/S1027451020020032>
22. *Evdokov O., Titov V., Tolochko B., Sharafutdinov M.* // Nucl. Instrum. Methods. 2009. V. 603. P. 194.
<https://doi.org/10.1016/j.nima.2009.03.001>
23. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ // Ред. совет Фисенко В.П. (пред.) и др. М. ЗАО “ИИА “Ремедиум” 2000. 398 с.
24. *Franken N.A.P., Rodermond H.M., Stap J. et al.* // Nature Protocols. 2006. V. 1. № 5. P. 2315.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
25. *Troitskii S.Y., Chuvilin A.L., Kochubei D.I. et al.* // Russ. Chem. Bull. 1995. V. 44. № 10. P. 1822.
<https://doi.org/10.1007/BF00707203>
26. *Ramírez-Expósito M.J., Martínez-Martos J.M.* // Curr. Neuropharmacol. 2019. V. 17. № 4. P. 342.
<https://doi.org/10.2174/1570159X16666180302120925>
27. *Basati G., Khaksarian M., Abbaszadeh S. et al.* // Stem Cell Investig. 2019. V. 6. № 38. P. 1.
<https://doi.org/10.21037/sci.2019.10.07>