

METALICKÉ NANOČÁSTICE V PROSTŘEDÍ TERAPEUTICKÉHO ULTRAZVUKU – STUDIUM VIABILITY NÁDOROVÝCH BUNĚK IN VITRO

METALLIC NANOPARTICLES AFFECTED BY THERAPEUTIC ULTRASOUND – THE IN VITRO STUDY OF CELL VIABILITY

Vladan Bernard¹, Adéla Kalužová^{1,2}

¹Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Biofyzikální ústav, Brno, Česká republika

²Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií,
Ústav biomedicínského inženýrství, Brno, Česká republika

Souhrn

Nanotechnologie a nanomateriály čím dál tím více zasahují do života běžného člověka. Z pohledu odborného jde o technologie a materiály s příslibem všestranného využití, jejichž působení a účinky na živé organismy nejsou stále plně vysvětleny. Z těchto důvodů vykazují extrémní nárůst zájmu v oblasti výzkumu četných vědeckých pracovišť. Objektem výzkumu v prezentovaném sdělení jsou metalické nanočástice a jejich účinek na lidské nádorové buněčné linie in vitro. V rámci experimentů byla hodnocena viabilita nádorových linií A375 při jejich kultivaci v prostředí nanočástic stříbra <100 nm a současné aplikaci ultrazvukového pole o intenzitě 1 W·cm⁻². Výsledky experimentů ukazují snížení buněčné viability, zejména při kombinovaném působení ultrazvukového pole a nanočástic.

Klíčová slova

buňky, nanočástice, nanomateriál, viabilita

Abstract

Nanotechnology and nanomaterials increasingly intervene in the life of an ordinary person. These belong to the technology and materials with the promise of high versatility. But, their action and effects on living organisms are still not fully understood. For this reason, nanotechnology exhibits an extreme surge of interest in the field of research of numerous scientific institutions. The objects of interest of the presented in vitro research are metallic nanoparticles and their effect on human tumor cell lines. We studied viability of A375 tumor cell lines during their cultivation in an environment of silver nanoparticles <100 nm and current application of ultrasonic field with intensity of 1 W·cm⁻². The outcomes from experiment show decreasing of viability of human tumor cell after exposing of ultrasound and nanoparticles separately, the maximal decreasing of cell viability was documented for combined treatment when ultrasound and nanoparticles were applied at the same time.

Keywords

Cells, nanoparticles, nanomaterials, viability

Úvod

Nanotechnologie může být definována jako multi-disciplinární aplikovaný vědní obor, který je provázaný s širokým spektrem dalších technicky i přírodovědně

orientovaných oborů. Mezi tyto s nanotechnologiemi úzce spjaté obory patří například inženýrství, fyzika, chemie, biologie či medicína. Neformální definice nanotechnologie, kterou lze najít v mnoha populárních knihách či webových stránkách, je následující:

„Nanotechnologie je aplikovanou vědou, která se zabývá výrobou a užíváním takových materiálů a částic, k jejichž vzniku je třeba cílených manipulací na úrovni jednotlivých atomů nebo jejich poměrně malých skupin“. Jinou, přesněji charakterizující definicí může být například: „Nanotechnologie je obor, věnující se manipulacím s hmotou na atomární a molekulární úrovni. Obecně platí, že nanotechnologie se zabývá vývojem materiálů, zařízení nebo jiných struktur majících alespoň jeden rozměr o velikosti 1-100 nm“ [1, 2].

Předmětem výzkumu prováděného na Biofyzikálním ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity jsou nanomateriály na jejich elementární úrovni v podobě metalických nanočástic rozměrů menších 100 nm. Takovéto nanočástice se vyskytují v mnoha komerčně dostupných výrobcích, například kosmetické přípravky, opalovací krémy, přípravky na úpravu vody, potraviny, funkční prádlo či lékařský spotřební materiál [3, 4]. Vliv metalických nanočástic na jednobuněčné a mnohobuněčné organismy je často diskutovaným tématem [5, 6], zejména s ohledem na bezpečnost jejich používání vzhledem k lidskému zdraví. Existují četné recentní publikace poukazující na toxicitu nanočástic, nejčastěji ve vztahu k účinkům nanočástic stříbra [7, 8]. Nanočástice stříbra nejsou ale jediným materiálem, u kterého byla toxicita sledována, jak dokazují publikace, věnující se toxicitě i jiných nanočástic [9, 10].

Otázkou zůstává, jakým způsobem bude toxicita metalických nanočástic - resp. potlačení buněčné viability - ovlivněna přítomností ultrazvukového pole. Existuje mnoho prací, poukazujících na možnost využití ultrazvukového pole jako nástroje pro posílení účinku léčiv či jako nástroje k cílenému doručení léčiv [11, 12]. Autoři popisují rozličné mechanismy, kterými působí ultrazvukové pole během tzv. sonodynamické terapie. Jedním z možných mechanismů je mechanické ovlivnění buněčných struktur, zejména membrán, které v důsledku usnadňuje vstup látek do nitra buněk a tím zvyšuje jejich intracelulární koncentraci [13]. Cílem presentovaného výzkumu je realizace experimentů studujících kombinované působení ultrazvukového pole a metalických nanočástic ve smyslu ovlivnění viability buněk nádorových linií *in vitro*.

Materiál a metody

Buněčná kultura

V rámci experimentu bylo použito nádorových buněk kožního melanomu A375, které byly kultivovány v prostředí živného media RPMI s přídavkem streptomycinu/penicilinu při 37 °C a 5% CO₂. Před experimentem byly buňky trypsinovány.

Experimentální skupiny

V rámci *in vitro* experimentu byly sledovány tyto experimentální skupiny:

- buňky inkubované pouze s nanočásticemi stříbra - Ag,
- buňky inkubované po vystavení ultrazvukovému poli po dobu 10 minut - Uz,
- buňky inkubované s nanočásticemi stříbra po vystavení ultrazvukovému poli po dobu 10 minut za přítomnosti nanočástic stříbra - Ag+Uz,
- buňky inkubované s nanočásticemi stříbra po vystavení ultrazvukovému poli po dobu 10 minut - Uz+Ag,

Kontrolní skupinu představují buňky neovlivněné ultrazvukem a bez obsahu stříbrných nanočástic v kultivačním prostředí - K.

Test viability

Jednotlivé experimentální skupiny buněk o finální koncentraci $5 \cdot 10^4$ buněk na ml byly kultivovány v čase 48 hodin na 96 jamkových deskách v prostředí živného media RPMI (s přídavkem či bez přídavku nanočástic stříbra, jehož výsledná koncentrace byla $7,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Po provedení experimentu ozvučením, přidáním nanočástic stříbra či vzájemnou kombinací těchto dvou faktorů byly buňky v inkubační době 48 hodin podrobeny MTT testu viability [14]. Hodnota viability byla stanovena měřením absorbance výsledného produktu MTT testu jednotlivých experimentálních skupin (pomocí Micro plate reader EL800 - Bio-Tek, USA) na vlnové délce 570 nm. Hodnota viability jednotlivých experimentálních skupin - úměrná měřené absorbanci - byla přepočítána na procentuální poměr vůči kontrolní skupině K.

Ultrazvukové pole

Pro ozvučení vzorků byl použit terapeutický ultrazvukový generátor BTL-07, pracující na frekvenci 1 MHz se sondou o aktivní ploše 4 cm². Buňky byly ozvučeny v horizontálním uspořádání po dobu 10 minut umístěné do otočné kyvety v polyethylénové zkumavce. Použitá výstupní intenzita ultrazvukového pole byla 1 W·cm⁻²; celý vzorek byl umístěn ve vodní lázni temperované na 37 °C ve vzdálenosti od hlavičky, která odpovídá blízkému ultrazvukovému poli.

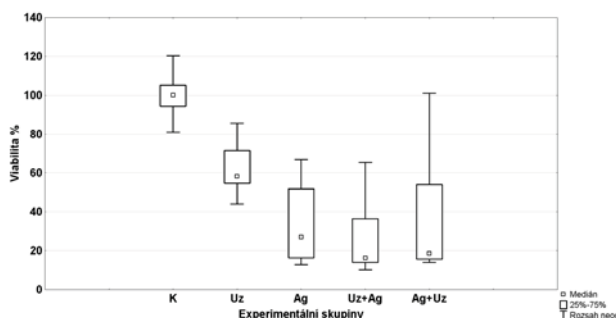
Statistické vyhodnocení

Pro jednotlivé experimentální skupiny byly stanoveny z opakovaných experimentů následující parametry – průměr, směrodatná odchylka, medián, minimum, maximum, dolní a horní kvartil. Jednotlivé experimentální skupiny byly mezi sebou testovány pomocí Mann-Whitney U-testu na hladině 0,05. K statistické analýze dat byl použit software STATISTICA 12.

Výsledky a diskuse

V provedených *in vitro* experimentech byla studována hodnota viability buněk lidského melanomu A375 po ovlivnění terapeutickým ultrazvukem

v blízkém poli, kultivací s nanočásticemi stříbra či jejich vzájemnou kombinací.



Obr. 1: Hodnota viability v čase 48 hodin pro jednotlivé experimentální skupiny K, Uz, Ag, Uz+Ag a Ag+Uz.

V rámci provedených experimentů byly nalezeny rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami, jak je patrné z výsledných grafů (viz Obr. 1). Pro všechny experimentální skupiny Uz, Ag, Ag+Uz a Uz+Ag bylo pozorováno snížení viability v sledovaném čase 48 hodin. Maximálního poklesu viability bylo dosaženo u buněk ovlivněných kombinovaným působením ultrazvukového pole a nanočástic stříbra (viz Obr. 1). Hodnota viability pro samotné působení nanočástic stříbra Ag byla ve srovnání s působením samotného ultrazvuku Uz nižší; vyjádřeno hodnotou mediánu 27,08 % u experimentální skupiny Ag ve vztahu ke kontrolní skupině oproti 58,35 % pro experimentální skupinu Uz.

Provedení Mann-Whitney testu ukázalo zejména signifikantní rozdíl mezi experimentálními skupinami Ag+Uz a Uz+Ag, jak je zpracováno v Tab. 1. Srovnáním těchto dvou způsobů kombinovaného působení ultrazvukového pole a nanočástic bylo ukázáno, že největšího poklesu viability bylo dosaženo u experimentální skupiny Uz+Ag, tedy v případě ozvučení buněčné suspenze a následně kultivace v přítomnosti nanočástic stříbra. Je ovšem nutné poznamenat, že vlastní hodnoty mediánů procenta viability těchto dvou experimentálních skupin nevykazují výrazně odlišné hodnoty a proto, i když je rozdíl statisticky signifikantní, nepředstavuje nalezený rozdíl významnou skutečnost v popisu účinků kombinovaného působení.

Presentovaná data ukazují na možnost existence kombinovaného působení metalických nanočástic, v našem případě stříbra a ultrazvukového pole. Při vzájemném porovnání získaných mediánů poklesu viability se zdá být výsledná hodnota viability pro experimentální skupiny Ag+Uz a Uz+Ag prostou sumací účinků, i přes zmíněný nalezený statistický rozdíl.

Tab. 1: Výsledky Mann-Whitney U-testu pro jednotlivé experimentální skupiny.

	K	Uz	Ag	Uz+Ag	Ag+Uz
K	-	<	<	<	<
Uz	<	-	<	<	<
Ag	<	<	-	<	•
Uz+Ag	<	<	<	-	<
Ag+Uz	<	<	•	<	-

Výsledky Mann-Whitney U-testu pro experimentální skupiny K, Uz, Ag, Uz+Ag a Ag+Uz. Symbol < - statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,05$); symbol • - bez statisticky signifikantního rozdílu ($p < 0,05$).

Vysvětlení nalezeného efektu lze přičítat jednak známému faktu toxicity nanočástic stříbra vůči savcím buňkám [3], jednak působením ultrazvukového pole na živé objekty. Je nutné uvážit, že prezentované experimenty byly provedeny v blízkém ultrazvukovém poli, čemuž odpovídá i poměrně vysoká hodnota ztráty viability takto exponovaných buněk. Výrazný vliv přítomnosti ultrazvukového pole a současné přítomnosti nanočástic, tj. objasnění možného efektu rozvolnění buněčných struktur, zejména buněčných membrán působením ultrazvukového pole, nebyl pro dané experimentální uspořádání pozorován. Jistou překážkou v prováděných experimentech může být také postupná agregace nanočástic do větších celků a snížení jejich efektivity účinku ve vztahu k prostupnosti do intracelulárních prostor.

Závěr

V provedených experimentech byl testován vliv terapeutického ultrazvuku v součinnosti s přítomností metalických nanočástic na změnu viability nádorových buněk lidského kožního melanomu. Tyto experimenty byly realizovány na popud iniciační otázky, zda nemůže být použito terapeutického ultrazvuku jako činitele, který ovlivní aktivitu metalických nanočástic. Takovéto ovlivnění buněčné viability kombinovaným působením nanočástic a ultrazvuku by mohlo být jak cílené - např. ve smyslu posílení onkologické léčby, tak náhodné - např. v případě běžné diagnostiky a současné přítomnosti nanočástic v lidském těle. Smyslnost toho výzkumu shledávají autoři zejména v souvislosti s narůstajícím množstvím různých nanočástic běžně se vyskytujících v životním prostředí člověka a otázkou jejich bezpečnosti.

Realizované experimenty ukazují na možnost přinejmenším sumace účinků ultrazvukového pole a stříbrných nanočástic, což ve svém důsledku vede k posílení poklesu viability testovaných buněčných kultur. Otevřenou otázkou s nutností provedení dodatečných experimentů k jejímu objasnění zůstává vliv posloupnosti působení ultrazvuku a nanočástic v souvislosti se

změnou buněčných struktur a vstupem nanočástic do intracelulárního prostoru - v prezentovaném výzkumu experimentální skupiny Ag+Uz a Uz+Ag.

Poděkování

Práce byla podpořena výzkumným grantem GACR 13-04408P. Autoři děkují paní Svatavě Modrové za technickou podporu v laboratoři tkáňových kultur.

Literatura

- [1] Emerich, D. F., Thanos, C. G., Nanotechnology and medicine. *Expert Opin Biol Ther* 2003, 3, 655-663.
- [2] Sahoo, S. K., Parveen, S., Panda, J. J., The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2007, 3, 20-31.
- [3] Ahamed, M., AlSalhi, M. S., Siddiqui, M. K. J., Silver nanoparticle applications and human health *Clinica Chimica Acta*, Volume 2010, vol. 411, p. 1841-1848.
- [4] Woodrow Wilson International Center for Scholars. A nanotechnology consumer products inventory. www.nanotechproject.org/consumerproducts 2007 Available at.
- [5] Bao Yong Sha, Wei Gao, Shu Qi Wang, Feng Xu, Tian Jian Lu Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles differs in four liver cells from human and rat *Original Research Article Composites Part B: Engineering*, Volume 42, Issue 8, December 2011, Pages 2136-2144.
- [6] Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G., Hoet, P., Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines, *Particle and Fibre Toxicology* 2009, 6:14.
- [7] Ahamed, M., AlSalhi, M. S., Siddiqui, M. K. J., Silver nanoparticle applications and human health, *Clinica Chimica Acta* 2010, 441, 1841-1848.
- [8] Mukherjee, S. G., O'Clonadh, N., Casey, A., Chambers, G. Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines, *Toxicology in Vitro* 2012, 26, 238-251.
- [9] Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G., Hoet, P., Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines, *Particle and Fibre Toxicology* 2009, 6, 1-12.
- [10] Sha, B., Gao, W., Wang S., Xu, F., Lu, T., Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles differs in four liver cells from human and rat, *Composites: Part B* 2011, 42, 2136-2144.
- [11] Ionel Rosenthal, I., Sostaric, J. Z., Riesz, P., Sonodynamic therapy-a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound *Ultrasonics Sonochemistry* 2004, 11, 349-363.
- [12] Junru Wu, J., Pepe, J., Rincón, M., Sonoporation, anti-cancer drug and antibody delivery using ultrasound, *Ultrasonics* 2006, 44, e21-25.
- [13] Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., Guy, R. H., Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: Implication for drug delivery, *Journal of Controlled Release* 2005, 104, 213-222.
- [14] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 1983, 16, 55-63.

*Mgr. Vladan Bernard, Ph.D.
Biofyzikální ústav
Lékařská fakulta
Masarykova univerzita
Kamenice 126/3, 62500 Brno*

*E-mail: vbernard@med.muni.cz
Phone: +420 549 496 577*