
Andrija Bižić

Citotoksični uticaj infracrvenog zračenja na HeLa ćelije tretirane nanočesticama zlata

Upotreba infracrvenog zračenja kao izvor energije za termalnu aktivaciju nanočestica zlata pokazuje veliki potencijal u tretiranju kancerskih oboljenja. U ovom radu ćelije cervikalnog kancera tretirane su nanočesticama zlata i potom izlagane zračenju infracrvenog dela spektra kako bi se ispitalo njihov zajednički citotoksični efekat na ćelije. Nakon izloženosti infracrvenom zračenju, nanočestice zlata apsorbuju i potom emituju energiju u vidu toplote što uzrokuje termalnu stetu targetovanim ćelijama. U radu je pokazano da zračenje tretiranih ćelija ima vrlo potentan citotoksični efekat na ćelije što znatno pospešuje mogućnost selektivnog ciljanja ćelija. Uspeh ovakve metode otvara široka vrata novim mogućnostima u što preciznijem uklanjanju pristva kancera u organizmu.

Uvod

Kancer je jedna od najopasnijih bolesti današnjice od koje pati veliki broj ljudi. Okarakterisan je neregulisanom proliferacijom ćelija i raznovrsnim mutacijama u molekulu DNK, širenjem kroz organizam u vidu metastaza, što zajedno daje zastrašujuće veliki procenat mortaliteta.

Uzrok razvijanja kancera nije u potpunosti poznat, zbog čega je samo lečenje znatno otežano. Postoje mnogi trenutni oblici tretmana: citostatici, hemoterapija, radio zračenje, ali nijedna od njih nije ćelijsko-specifična, što dovodi do nanošenja velike štete zdravim ćelijama. Pored pomenutih rizika i nedovoljno dobrih rezultata,

potreba za novim načinima lečenja konstantno raste. Najveći problem u razvijanju bilo kakve trepanije predstavlja lokalizacija njenog delovanja – uništavanje kancerskih ćelija uz što manje posledice po okolno tkivo i ostatak organizma. U poslednjih par godina, istraživanja su pokazala potencijal u tretiranju i detektovanju kancera uz pomoć nanočestica zlata (Gobin *et al.* 2007; Raof *et al.* 2012). Nanočestice zlata su jako malih dimenzija, poluprovodne su, mogu apsorbovati elektromagnetno zračenje određenih talasnih dužina i emitovati je u vidu toplotne energije (Glazer *et al.* 2010). Najčešće upotrebljavana metoda selektivnog targetovanja maligno transformisanih ćelija uključuje antitela na EGF (Epidermal Growth Factor) receptor (Normanno *et al.* 2006; Martinelli *et al.* 2009).

Uz pomoć ovih antitela, efikasnost detektovanja kancerskih ćelija se znatno povećala, dok su se antitela takođe pokazala kao dobar metod inhibicije ćelijske deobe, migracije i metastaze, kao i dostavljanja nanočestica zlata na cilj, što ultimativno rezultuje indukovanjem apoptoze (Vokes i Chu 2006). Zračenjem konjugovanih antitela sa nanočesticama zlata, uzrokuje se hipertermija koja bi bila fatalna po ciljane ćelije kancera i tako se efikasno i selektivno eliminiše njihovo prisustvo. Velika prednost ove metode je što radio talasi ne interaguju sa biološkim tkivom, a to omogućuje tretiranje na bilo kojoj dubini u tkivu. Raof i saradnici su uz pomoć visokofrekventnih radio talasa pokazali veliku delotvornost metode (Raof *et al.* 2012), što otvara široki dijapazon mogućnosti za ispitivanje novih pristupa ka sto preciznijem uklanjanju

Andrija Bižić (1995), Beograd, Vlajkovićeva 27, učenik 4. razreda Prve beogradske gimnazije

MENTOR: Luka Mihajlović, diplomirani biohemičar, Katedra za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

maligno transformisanih ćelija. Iako je delovanje infracrvenih (IC) talasa moguće samo do dubina od nekoliko centimetara u tkivu, manja talasna dužina od radio talasa bi trebalo da bude kompenzovana većom frekvencijom i potentnijim transferom termalne energije na nanočestice, što će rezultovati u bržem dostizanju citotoksičnog nivoa temperature (Raof *et al.* 2012).

Cilj ovog rada je da se ispita termalna citotoksičnost nanočestica zlata na HeLa ćelije kancera grlića materice izložene zračenju IC opsega spektra.

Materijal i metode

Zračenje korišćeno u eksperimentu. Za ovaj projekat izabrano je zračenje frekvencije IC regiona spektra ($14000-10\text{ cm}^{-1}$) zbog ograničene prodorne moći u ljudsko tkivo, što uzrokuje veću efikasnost u tretiranju površnih tumora i omogućava sprovođenje eksperimenta *in vitro*.

Pripremanje nanočestica zlata. Zlato je rastvoreno u carskoj vodi ($\text{HNO}_3 : \text{HCl} = 1 : 3$) i nakon 4 sata rastvor je potpuno uparen, a zlato resuspendovano u 17% rastvor Trinatrijum (III) citrata. Koncentracija nanočestica u rastvoru je spektrofotometrijski određena ($\lambda = 550\text{ nm}$).

Upotrebljivane ćelije. Ćelije korišćene u ovom eksperimentu su bile ćelije cervikalnog kancera HeLa ćelijske linije. Pre tretmana ćelije su 8 dana bile kultivisane za predstojeći rad. Uz kontrolnu grupu koja nije ni zračena niti tretirana nanočesticama zlata, korišćena su još dve grupe različitih uslova kako bi se eliminisala varijabilnost dobijenih podataka – jedna grupa koja je tretirana nanočesticama zlata ali nije izložena zračenju, i druga grupa koja je zračena bez prisustva nanočestica zlata. Eksperimentalne grupe su prikazane u tabeli 1.

Tabela 1. Grupe ćelija korišćenih u eksperimentu

	Tretirane koloidima	Netretirane
Izložene zračenju	3 grupe	1 grupa
Neizložene	1 grupa	1 grupa

Tretiranje ćelija koloidima zlata. Ćelije su pre tretmana prebačene u svez medijum u odnosu 1 : 3 (ćelije : medijum), a zatim tretirane tečnim rastvorom koloidnih nanočestica zlata u odnosu 4 : 1 (ćelije : rastvor). Nakon tretmana koloidnim zlatom, ćelije su inkubirane na 5% CO_2 , 37°C u periodu od 12 h. Iradijacija je bila vršena uz pomoć tri LE diode na talasnoj dužini od 830 nm (12048.19 cm^{-1}), intenziteta 200 mA, pri naponu od 2.8 V u trajanju od 4×15 minuta, sa pauzama od 45 minuta po grupi, u ukupnom trajanju od 4 sata.

Određivanje vijabilnosti ćelija. Ćelije su brojane na hemocitometru, koristeći trypan blue kao specifičnu boju (trypan blue boji mrtve ćelije). Pre bojenja trypan blue-om, ćelije su centrifugirane 5 min na 2500 rpm i vorteksovane pre postavljanja na hemocitometar.

Rezultati i diskusija

Koncentracija koloidnih nanočestica zlata, izmerena spektrofotometrijski je izračunata koristeći Lambert-Beerov zakon, i iznosila je $C = 2.85 \cdot 10^{-9}\text{ mol/dm}^3$

Nakon tretiranja ćelija, citotoksičnost koloidnih čestica zlata je bila posmatrana kroz odnos broja preživelih ćelija prema mrtvim ćelijama. Izračunata je srednja vrednost tri eksperimentalne grupe (tretirane nanočesticama zlata i izložene IC zračenju), i ovaj rezultat je poređen sa ostalim eksperimentalnim grupama (tabela 2).

Tabela 2. Odnos broja preživelih i broja mrtvih ćelija ($\times 10^4$)

	Tretirane koloidima	Netretirane
Izložene zračenju	21/22	15/12
Neizložene	16/2	5/0

Kao što se može videti iz tabele 2, uticaj nanočestica zlata na grupe ćelija koje su izložene IC zračenju u odnosu na kontrolnu, nezračenu grupu, pokazuje jako izražen citotoksični efekat. Kao dodatno osiguravanje rezultata, kontrolna grupa ne pokazuje nikakve znake citotoksičnog efekta na ćelije. Sa druge strane, tretman nanočesticama zlata samostalno nema primetno štetan

efekat na ćelije, što se može videti iz odnosa preživelih i mrtvih ćelija grupe koja je tretirana nanočesticama bez zračenja (16 : 2). Primećeno je veliko umiranje ćelija u drugoj grupi ćelija koja je samo izložena zračenju, bez prisustva nanočestica zlata (15 : 12), što se može objasniti samim citotoksičnim uticajem zračenja na ćelije. Chang i saradnici su pokazali da upravo IC deo spektra može izazvati prekid ćelijskog ciklusa u G2 kontrolnoj tački tokom proliferacije ćelija adenokarcinoma, čime su pokazali potencijalnu ulogu ovog zračenja u terapiji karcinoma pluća (Chang *et al.* 2013). U odnosu na slične eksperimente vršene pre (Raof *et al.* 2012), rezultati pokazuju da je metoda uništavanja HeLa ćelija apsorbovanjem elektromagnetnog zračenja i rasipanja dobijene energije u vidu toplote, što podiže zanimljive implikacije u tretiranju kancerskih oboljenja, kao i detekciji koristeći imuno-gold metode elektron transmisiona mikroskopije. Prethodni problemi obrađeni u literaturi ukazuju da postoji mogućnost apsorpcije IC zračenja od strane pufera, koji lažno pozitivno doprinosi citotoksičnom efektu zlatnih nanočestica (Glazer *et al.* 2010; Cardinal *et al.* 2008). Naši rezultati pokazuju da to nije slučaj, i da se sav citotoksični efekat može pripisati delovanju IC zračenja. U prilog našim podacima o praktičnosti primene ove metoda kao potencijalne anti-tumor terapije ide podatak teorijskih istraživanja apsorpcije elektromagnetnog zračenja od strana zlatnih nanočestica. Hanson i saradnici su pokazali da apsorpciju elektromagnetnog zračenja i dalje raspanje energije u vidu toplote podstiče kisela sredina ćelija kancera, nastala zbog prebacivanja oksidativnog metabolizma ćelije na anareobnu glikolizu (Wartburgov efekat) (Hanson *et al.* 2011).

Zaključak

Rezultati potvrđuju efikasnost citotoksičnog dejstva IC zračenja i nanočestica zlata na HeLa ćelija. Planovi za nastavak ispitivanja uključuju povećanje broja eksperimentalnih grupa, upotrebu drugih ćelijskih linija, kao i ispitivanje IC zračenja različitih energija i talasnih dužina.

Zahvalnost. Ivi Pruner za usmerenje u radu sa ćelijama, Voinu Petroviću za pomoć u izolo-

vanju nanočestica zlata, Milici Vunjak za asistenciju u laboratoriji i Alekseju Drinu za analizu rezultata i kritike tokom izrade rada.

Literatura

- Cardinal J., Klune J. R., Chory E., Jeyabalan G., Kanzius J. S., Nalesnik M., Geller D. A., 2008. Noninvasive radiofrequency ablation of cancer targeted by gold nanoparticles. *Surgery*, **144**: 125.
- Chang H.-Y., Shih M.-H., Huang H.-C., Tsai S.-R., Juan H.-F., Lee S.-C. 2013. Middle Infrared Radiation Induces G2/M Cell Cycle Arrest in A549 Lung Cancer Cells. *PLoS ONE*, **8**: e54117.
- Glazer E. S., Zhu C., Massey K. L., Thompson C. S., Kaluarachchi W. D., Hamir A. N., Curley S. A., 2010. Noninvasive Radiofrequency Field Destruction of Pancreatic Adenocarcinoma Xenografts Treated with Targeted Gold Nanoparticles. *Clinical Cancer Research*, **16**: 5712.
- Glazer E. S., Curley S. A. 2010. Radiofrequency field-induced thermal cytotoxicity in cancer cells treated with fluorescent nanoparticles. *Cancer*, **116**: 3285.
- Gobin A. M., Lee M. H., Halas N. J., James W. D., Drezek R. A., West J. L. 2007. Near-Infrared Resonant Nanoshells for Combined Optical Imaging and Photothermal Cancer Therapy. *Nano Letters*, **7**: 1929.
- Hanson G. W., Monreal R. C., Apell S. P. 2011. Electromagnetic absorption mechanisms in metal nanospheres: Bulk and surface effects in radiofrequency-terahertz heating of nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, **109**: 124306.
- Martinelli E., De Palma R., Oreditura M., De Vita F., Ciardiello F. 2009. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clinical & Experimental Immunology*, **158**: 1.
- Normanno N., De Luca A., Bianco C., Strizzi L., Mancino M., Maiello M. R., Carotenuto A., De Feo G., Caponigro F., Salomon D. S. 2006.

Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, **366**: 2.

Raof M., Corr S. J., Kaluarachchi W. D., Massey K. L., Briggs K., Zhu C., Cheney M. A., Wilson L. J., Curley S. A. 2012. Stability of antibody-conjugated gold nanoparticles in the endolysosomal nanoenvironment: implications for noninvasive radiofrequency-based cancer therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **8**: 1096.

Vokes E. E., Chu E. 2006. Anti-EGFR therapies: clinical experience in colorectal, lung, and head and neck cancers. *Oncology* (Williston Park, N.Y.), **20**: 15.

Andrija Bižić

Cytotoxic Effect of Infrared Radiation on HeLa Cells Treated with Gold Nanoparticles

With cancer being one of the most dangerous diseases of the present, there are many different treatments for it, most of which are not cell specific and thus inflict damage on healthy cells as well. The use of infrared radiation as a source of energy for thermal activation of gold nanoparticles shows great potential in treatment of cancerous diseases, with increased accuracy. Another advantage of this method is the fact that infrared radiation does not interact with biological tissue and would therefore be applicable almost anywhere in the body. In this project cervical cancer cells were treated with nanoparticles of gold and subsequently exposed to electromagnetic radiation of the infrared spectrum in order to examine their combined cytotoxic effect on the cells. Following the exposure to the radiation, the gold nanoparticles absorb and then emit the energy as heat which causes thermal damage to the targeted cells nearby. It was demonstrated in the experiment that irradiation of treated cells has a very potent cytotoxic effect on the cells which greatly improves the possibility of selective cell targeting. The success of such a method opens a wide range of new directions in highly accurate removal of cancerous cells from an organism.

