

ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ПРИДАТОЧНОГО АППАРАТА ГЛАЗА НА ОСНОВЕ СИНТЕЗА БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ

С.В. Саакян¹, Д.А. Складнев², А.П. Алексеева¹, В.В. Сорокин², А.Ю. Цыганков¹

¹ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» МЗ РФ, Москва, Россия

²ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

СВС: <https://orcid.org/0000-0001-8591-428X>; svsaakyan@yandex.ru, ДАС: <https://orcid.org/0000-0001-6929-6397>; skladda@gmail.com, АПА: <https://orcid.org/0000-0002-7568-3016>; chonai.94@mail.ru, ВВС:

<https://orcid.org/0000-0002-4166-3105>; a.a.sorokin@inbox.ru, АЮС: <https://orcid.org/0000-0001-9475-3545>;

alextsygankov1986@yandex.ru

EXPRESS IN SITU DIAGNOSTICS OF MALIGNANT OCULAR ADNEXAL TUMORS ON THE BASE OF BIOGENIC NANOPARTICLES SYNTHESIS

S.V. Saakyan¹, D.A. Skladnev², A.P. Alekseeva¹, V.V. Sorokin², A.Iu. Tsygankov¹

¹Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russia

²Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, Russia

Резюме: В структуре онкологических заболеваний глаза опухоли придаточного аппарата встречаются наиболее часто, их дифференциальная диагностика может представлять значительные сложности, окончательный диагноз ставится по результатам морфологического исследования. Известно, что опухолевые клетки отличаются от нормальных не только морфологически, но и более высоким уровнем клеточного метаболизма. Это обуславливает способность опухолевых клеток с высокой скоростью восстанавливать катионы и генерировать *in situ* биогенные наночастицы из искусственно внесённого источника катионов серебра. Цель исследования: разработка нанобиотехнологического метода экспресс-диагностики опухолей придаточного аппарата глаза. Материалы и методы. Образцы опухолевых тканей придаточного аппарата глаза и здоровых тканей из того же глаза помещали в стерильные аликвоты раствора соли серебра и оценивали их восстановительную активность по уровню синтеза биогенных наночастиц. Формирование наночастиц регистрировали спектрометрическим методом. Результаты. При сравнительном анализе восстановительной активности зафиксирован более высокий уровень формирования *in situ* биогенных наночастиц серебра в реакционной смеси со злокачественными опухолями (3.8 ± 0.5) придаточного аппарата глаза по сравнению с доброкачественными (2.2 ± 0.4). Выводы. Разрабатываемый метод позволяет проводить экспресс-диагностику злокачественных и доброкачественных опухолей придаточного аппарата глаза для оптимизации тактики хирургического лечения. Для уточнения уровней восстановительной активности различных

видов опухолей проводятся дальнейшие исследования.

Ключевые слова: Опухоль, придаточный аппарат глаза, диагностика, биогенные наночастицы серебра.

DOI: 10.25792/HN.2022.10.2.S2.94-97

Для цитирования: Саакян С.В., Складнев Д.А., Алексеева А.П., Сорокин В.В., Цыганков А.Ю. Экспресс-диагностика злокачественных опухолей придаточного аппарата глаза на основе синтеза биогенных наночастиц. *Head and neck. Russian Journal.* 2022; 10 (2, Прил. 2):94-97.

Abstract: In the structure of ocular oncological diseases, tumors of eye adnexa are most common, their differential diagnosis can present significant difficulties, the final diagnosis is made according to the results of morphology study. It is known that tumor cells differ from normal ones not only morphologically, but also by a higher level of cellular metabolism. This determines the ability of tumor cells to restore cations at a high rate and generate *in situ* biogenic nanoparticles from artificially introduced source of silver cations.

Aim: development of nanobiotechnological method for express diagnostics of ocular adnexal tumors based on the biogenic synthesis of silver nanoparticles. **Materials and methods.** Ocular adnexal tumors samples and healthy tissues from the same eye were placed in sterile aliquots of a silver salt solution and their reducing activity was evaluated by the level of biogenic nanoparticle synthesis. The formation of nanoparticles was recorded by the spectrometric method. **Results.** A comparative analysis of the reducing activity revealed a higher level of *in situ* formation of biogenic silver nanoparticles in the reaction mixture with malignant

tumors (3.8 ± 0.5) of ocular adnexa to benign ones (2.2 ± 0.4).

Conclusion. The developed method allows for express diagnostics of malignant and benign tumors of ocular adnexa to optimize surgical treatment tactics. Further studies are being conducted to clarify the levels of restorative activity of various types of ocular adnexal tumors.

Keywords: Tumor, eye adnexa, diagnostics, biogenic silver nanoparticles

For citations: Saakyan S.V., D Skladnev.A., Alekseeva A.P., Sorokin V.V., Tsygankov A. Iu. Express in situ diagnostics of malignant ocular adnexal tumors on the base of biogenic nanoparticles synthesis. *Head and neck. Russian Journal.* 2022; 10 (2, Suppl. 2): 94-97 (In Russian).

Введение. Наиболее частой патологией среди новообразований органа зрения являются опухоли придаточного аппарата глаза и составляют около 75% всех опухолей органа зрения, среди которых преобладают новообразования век и конъюнктивы [1,2]. Несмотря на их видимую локализацию и возможности современных диагностических методов исследования, их дифференциальная диагностика может представлять значительные сложности [1,3]. Неправильная постановка первоначального диагноза и, как следствие, неправильный выбор лечебной тактики у преобладающего числа пациентов, приводит к рецидиву злокачественной опухоли и может представлять угрозу для жизни пациента [4,5]. Базовым методом лечения опухолей придаточного аппарата глаза остается хирургическое максимально полное удаление опухоли при оптимальном сохранении видимых здоровых тканей [1,6]. В настоящее время дооперационная диагностика с целью определения объема хирургического вмешательства проводится в основном с помощью клинического осмотра и цитологического исследования. При необходимости могут применяться дополнительные неинвазивные способы диагностики, а окончательный диагноз ставится по результатам морфологического исследования. Известно, что опухолевые клетки отличаются от нормальных клеток не только морфологически, но и более высоким уровнем клеточного метаболизма и биосинтеза [7,8]. Эти особенности опухолевых клеток проявляются в способности с высокой скоростью восстанавливать катионы, что приводит к последующему формированию *in situ* биогенных наночастиц металлов [9,10]. Уточнение характера восстановительной активности опухолей

придаточного аппарата глаза позволит обеспечить дооперационную или интраоперационную экспресс-диагностику опухолей придаточного аппарата глаза для определения необходимого объема хирургического вмешательства и тактики лечения пациента.

Цель исследования – разработка инновационного нанобиотехнологического метода экспресс-диагностики опухолей придаточного аппарата глаза на основе биогенного синтеза наночастиц серебра.

Методы. Исследование было проведено на 73 образцах опухолей от пациентов с клинически установленным диагнозом опухоли придаточного аппарата глаза, проходивших лечение в отделе офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» МЗ РФ. Всем пациентам проведен стандартный офтальмологический осмотр, а также дополнительные инструментальные обследования. Все исследования проводились с согласия пациентов. Проводимые исследования были одобрены Этическим комитетом.

В качестве исследуемой группы использовали биопсию из опухолевой ткани, в качестве контрольного образца брали здоровую ткань из того же глаза. Образцы опухолевой (С) и здоровой (N) ткани помещали в стерильные пластиковые пробирки для транспортировки. Дальнейшие исследования выполнялись на базе отдела патофизиологии и биохимии, клинико-диагностической лаборатории. Измерение массы каждого из исследуемых фрагментов образцов тканей проводили на аналитических весах СРА225 D (Sartorius, Германия). В качестве источника катионов серебра в каждую из пробирок с образцами тканей добавляли по 500 мкл стерильного раствора аммиака серебра $Ag(NH_3)_2NO_3$. Для оптимизации режима сравнения восстановительных способностей тканей С и N в предварительных экспериментах использовали концентрации $Ag(NH_3)_2NO_3$ 1 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,125 мг/мл и т.д. с шагом в 2:1. Реакцию восстановления катионов Ag^+ в присутствии образцов тканей проводили в термостатируемом шейкере ST-3 (Elmi, Латвия), длительность реакции восстановления варьировали от 3 до 20 минут. Далее из каждой из пробирок по 100 мкл реакционной смеси переносили в отдельные лунки микропланшета. Спектрометрическое определение восстановительной активности опухолей придаточного аппарата глаза проводили путем измерения оптической плотности (А) реакционных смесей со сформированными биогенными наночастицами серебра на многофункциональном фотометре для микропланшет Synergy MX (Bio-Tek, США) при фиксированных длинах волн (λ) близких

к специфическим для наночастиц серебра: 395, 400, 405, 410, 415, 420 нм. Полученные результаты измерений автоматически сохранялись в виде таблицы Excel. Статистическая обработка результатов проводилась в операционной системе Windows 10 с использованием лицензионных программ MS Excel, вычислялись средние величины показателей и их ошибки.

Результаты. В данной работе представлены предварительные результаты исследования по разработке нанобиотехнологического метода экспресс-диагностики опухолей придаточного аппарата глаза на основе биогенного синтеза наночастиц серебра. Всего было обследовано 73 больных со злокачественными (n=20) и доброкачественными (n=53) новообразованиями придаточного аппарата глаза, выявленными клинически. По результатам сравнительного анализа было показано, что разница метаболической активности злокачественных и доброкачественных опухолей придаточного аппарата глаза может быть выявлена по их способности восстановления *in situ* ионов серебра с последующим формированием биогенных наночастиц. Каждый из показателей оптической плотности реакционных смесей с биогенными наночастицами, сформированными в присутствии доброкачественных или злокачественных опухолей анализировали в сравнении с оптической плотностью реакционной смеси с биогенными наночастицами, сформированными в присутствии соответствующих парных образцов здоровой ткани из контрольной группы.

На основании результатов сравнения оптической плотности реакционных смесей было показано, что уровни восстановительной активности в пробах со злокачественными или доброкачественными опухолями придаточного аппарата глаза выше, чем в контрольных образцах аналогичных здоровых тканей в каждой паре проб. При сравнительном анализе восстановительной активности зафиксирован более высокий уровень формирования *in situ* биогенных наночастиц серебра в реакционной смеси со злокачественными опухолями придаточного аппарата глаза по сравнению с доброкачественными (табл.1).

Наиболее показательным оказался процесс формирования наночастиц серебра при концентрации раствора аммиака серебра 0,062 мг/мл и 0,031 мг/мл. Разница восстановительных способностей тканей С и N, определённая по оптической плотности реакционных смесей с биогенными наночастицами серебра, была заметна с пятой минуты реакции восстановления катионов серебра. Полученные результаты позднее

подтверждались данными патогистологического исследования.

Табл. 1. Сравнение восстановительной активности С и N тканей по их способности формировать *in situ* биогенные наночастицы серебра

| | Соотношение $A_{\text{опухоль}}/A_{\text{контроля}}$ при $\lambda=400$ нм на пятой минуте реакции восстановления |
|----------------------------------|--|
| Доброкачественные опухоли (n=53) | 2.2±0.4 |
| Злокачественные опухоли (n=20) | 3.8±0.5 |

Обсуждение. Важнейшим отличительным признаком опухолевых клеток является метаболическое перепрограммирование, связанная с ним их аномальная неконтролируемая пролиферация и повышенный уровень метаболизма [8,11]. Данные изменения проявляются в усилении способности опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками выступать в роли восстановителя катионов для формирования биогенных наночастиц металлов [9,10]. Однако, ранее исследователи не использовали оценку уровня биогенного синтеза наночастиц металлов *in situ* для детекции различий доброкачественных и злокачественных опухолей придаточного аппарата глаза. Информационный поиск проводился с использованием интернет-ресурсов (PubMed, Scopus, ScienceDirect, E-library, Google Scholar).

Мы впервые показываем возможности сравнительного анализа показателей уровня формирования *in situ* биогенных наночастиц серебра, сформированных в присутствии опухолей придаточного аппарата глаза для выявления различий доброкачественных и злокачественных опухолей. В нашем исследовании более высокие уровни формирования биогенных наночастиц серебра в присутствии фрагментов опухолевых тканей подтвердили возможность опираться на метаболические различия тканей для детекции доброкачественных и злокачественных опухолей придаточного аппарата глаза. Все контрольные препараты здоровых тканей из того же глаза демонстрировали низкие уровни формирования биогенных наночастиц серебра. Полученные результаты позволяют продолжить исследования для выявления различий между уровнями восстановительной активности различных видов опухолей придаточного аппарата глаза.

Заключение. В соответствии с полученными результатами можно сделать вывод, что биогенный

синтез наночастиц серебра тканей может быть положен в основу для детекции опухолей придаточного аппарата глаза. Разрабатываемый нами метод позволяет проводить экспресс-диагностику злокачественных и доброкачественных опухолей придаточного аппарата глаза для оптимизации тактики хирургического лечения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Brovkina A.F., Valsky V.V., Gusev G.A., et al. Ophthalmooncology. Manual for Physicians. — Moscow, Meditsina Publishers, 2002 — 424 p.: ill. (In Russian).
2. Merabishvili V.M., Merabishvili E.N. The Prevalence of Malignant Tumors of the Eye and Adnexa (C69). Ophthalmology in Russia. 2020;17(3):495-501. (In Russian).
3. Panova I.E., Vinogradova J.N., Samkovich E.V. Lymphoma under disguise of conjunctivitis (clinical observations). Russian Ophthalmological Journal. 2019;12(1):92-96. (In Russian).
4. Brovkina A.F., Panova I.E., Saakian S.V. Ophthalmic oncology: achievements over the last two decades. Vestnik Oftalmologii. 2014;130(6):13-19. (In Russian).

5. Panova I.E., Arakelyan A.E., Kuchenkova I.A. Recurrent malignant tumors of the eyelid. Head and Neck Tumors (HNT). 2016;6(4):26-29. (In Russian).
6. Grusha Y.O., Ismailova D.S., Rizopulu E.F. surgical treatment for malignant epithelial eyelid neoplasms. Head and Neck Tumors (HNT). 2012;(2):24-28. (In Russian).
7. Anshup A., Venkataraman J.S., Subramaniam C., et al. Growth of gold nanoparticles in human cells. Langmuir. 2005 Dec 6;21(25):11562-7.
8. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
9. Gao S., Chen D., Li Q., et al. Near-infrared fluorescence imaging of cancer cells and tumors through specific biosynthesis of silver nanoclusters. Sci Rep 4, 4384 (2014).
10. Singh A., Gautam P.K., Verma A., et al. Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. Biotechnol Rep (Amst). 2020;25:e00427. Published 2020 Jan 31.
11. Korshunov D.A., Kondakova I.V., Shashova E.E. Modern perspective on metabolic reprogramming in malignant neoplasms // Biochemistry Moscow 2019;84(10):1129-42. Modern Perspective on Metabolic Reprogramming in Malignant Neoplasms. Biochemistry (Moscow), Volume 84(10), 2019.