УДК 616-006-085.277.3:615.849.11-092.9

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ РАДІОЧАСТОТНОЇ ГІПЕРТЕРМІЇ ТА МАГНІТОЧУТЛИВОГО НАНОКОМПЛЕКСУ НА КАРЦИНОМУ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС

Орел В.Е.[1], Шевченко А.Д.[2], Дзятковська Н.М.[1], Ніколов М.О.[1] ,
Романов А.В.[1], Бурлака А. П. [3], Лукін С. М. [3], Щепотін І.Б.[1]
[1]*Національний інститут раку МОЗ України, Київ*
[2]*Інститут металофізики ім. Г.В. Курдюмова НАН України*
[3] *Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ*

Експериментальні та клінічні дослідження проведені за останнє десятиріччя свідчать про перспективу використання в якості протипухлинних препаратів магніточутливих нанокомплексів (МНК) на основі наночасток оксиду заліза магнетіта (Fe_3O_4), маггеміта (γ-Fe_2O_3) та протипухлинного антибіотика антрациклінового ряду доксорубіцину (ДР). Основна теоретична привабливість цього підходу полягає в можливості дистанційно керованої цілеспрямованої доставки МНК й наступне підсилення його протипухлинної активності електромагнітним полем при радіочастотній гіпертермії (РГТ) [9]. Разом з цим пілотні клінічні дослідження проведенні в ряді країн світу з використанням наночасток свідчать про несуттєвий прогрес в результатах комплексного лікування онкологічних хворих [11].

Основні проблеми, які гальмують широке впровадження в клінічну практику комплексного лікування з використанням МНК при РГТ можуть бути зведенні до нижче приведеного переліку. Незначна поверхнева селективність мікро- та наночасток поміж злоякісними та нормальними клітинами; РГТ МНК в злоякісних пухлинах при температурах вище 41°С може супроводжуватись формуванням термотолерантності та терморезистентності на клітинному рівні внаслідок ініціювання синтезу білків теплового шоку; ймовірне виникнення побічних ефектів в серцево-судинній системі пацієнтів внаслідок обмеженої переносимості ними сеансу РГТ при температурах вище 41°С; сповільнена біодеструкція наночасток в організмі і побічні ефекти накопичення їх в печінці, селезінці, м'язах та інших органах [10].

В основі вирішення нами вищезазначених проблем — відома фундаментальна наукова концепція. В процесі хіміотерапії ДР помірна РГТ, ініційована неоднорідним електро-магнітним полем, підвищує кровотік і оксигенацію в пухлині та її судинну проникність для лікувальних препаратів за участю активних форм кисню та азоту, та збільшувати вірогідність пошкодження препаратом ДНК злоякісних пухлин [8].

Виходячи з вищезазначеного метою роботи було експериментальне дослідження можливості збільшення ефективності протипухлинної дії МНК на основі наночасток оксиду заліза і ДР при радіочастотній гіпертермії карциноми легені Льюїс.

Матеріал і методи дослідження

Трансплантована карцинома легені Льюїс. Дослідження впливу механомагнетохімічно синтезованого МНК та наступного електромагнітного опромінення (ЕО) тварин на протипухлинну активність комплексу та виживаність тварин було проведено на 49 мишах лінії C57BL/6 розводки віварію масою 20 (±2) г з перещепленою карциномою легені Льюїс. Трансплантований штам — карцинома легені Льюїс — отримано у клітинному банку ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України. Трансплантацію пухлинних клітин карциноми Льюїс здійснювали введенням мишам в праве стегно суспензії клітин $2 \cdot 10^5$ клітин на тварину в об'ємі 0,2 мл в середовищі 199.

В перший серії досліджень впливу МНК на пухлину тварини були розподілені на три групи, кожна з яких складалася з 7 тварин. 1-а група — контроль (без введення ДР, МНК і РГТ); 2-а група — введення офіцінального (ОФ) ДР; 3-я група — введення МНК та РГТ. Введення ДР тваринам проводили в дозі 3 мг/кг, МНК: ДР — 3 мг/кг, Fe_3O_4 — 3 мг/кг, в об'ємі 0,1 мл у розчині NaCl у венозний синус ока тварин. При введенні МНК в зоні пухлини розташовували постійний магніт з магнітною напруженістю 1990 А/м для локалізації МНК в пухлинних клітинах.

В другий серії досліджень впливу РГТ та парамагнітного (ПМ) ДР тварини були розподілені на чотири групи, кожна з яких складалася з 7 тварин. 1-а група — контроль (без введення ДР і РГТ); 2-а група — введення ОФ ДР; 3-я група — введення ПМ ДР; 4-а група — введення ПМ ДР + РГТ. Введення ДР тваринам проводили у хвостову вену тварин в дозі 2 мг/кг в об'ємі 0,2 мл у розчині NaCl.

Введення препаратів та РГТ починали на 3 добу після перещеплення пухлини і проводили 1 раз в 2 доби. Весь курс складався з 5 ін'єкцій та 5 сеансів РГТ. Строк спостереження за тваринами складав 21 добу.

Для РГТ використовували локальне просторово-неоднорідне ЕО прототипу апарата "Магнітерм"

(Радмір, Україна). Параметри ЕО: частота — 40 МГц, вихідна потужність — 60 Вт. Аплікатор апарата — рамочний, з розмірами 2х2,5 см та профілем у формі дуги кола з радіусом кривизни 2,3 см. Внутрішньопухлинна температура не перевищувала 37,9 °С.

Об'єм пухлини заміряли і розраховували відповідно до роботи [7]. Розміри метастазів та антиметастатичну активність — індекс інгібування метастазів (ІІМ), розраховували згідно роботи [1].

Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно із нормами, встановленими законом України № 3447 — IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" і норм, прийнятих в Європейській конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей від 20.09.1985 [4].

Магніточутливий нанокомплекс та парамагнітний доксорубіцин. МНК був синтезований на основі наночасток оксиду заліза Fe_3O_4 з KCl, діаметром 20-40 нм, отриманих з застосуванням технології електронно-променевого випаровування та конденсації в вакуумі неорганічних матеріалів [2] та ДР виробництва Пфайзер Італія С.р.л., Італія. В роботі досліджували МНК та ПМ ДР отриманий з використанням механомагнето-хімічної технології [3]. Магнітні характеристики зразків ліофілізованих тканин та препаратів, отримані методом магнітометрії на вібраційному магнітометрі "Vibrating Magnetometer 7404 VSM" (фірма "Lake Shore Cryotronics, Inc.", США) наведені в табл.1. Слід відзначити, що відібрані для дослідження зразки мали суттєво різні магнітні характеристики. Так магнітні характеристики зразки ліофілізованих тканин м'язових тканин задніх кінцівок нормальних мишей мали діамагнітні властивості, а для карциноми легені Льюїс були притаманні властивості м'якого феромагнетику. Препарати мали наступні магнітні характеристики. ОФ ДР — діамагнетик, ПМ ДР — парамагнетик та МНК — м'який феромагнетик.

Радіоспектроскопія. Спектри електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) реєстрували на модернізованому спектрометрі марки РЕ1307 (ЗЕПС АН) за температури рідкого азоту (77°К) в циліндричному резонаторі з модою $H01^1$, на частоті близько 9,15 ГГц. Потужність надвисокочастотного випромінювання складала 40 мВт. Використовували модуляцію магнітного поля частотою 100 кГц. Пробу розміщували у кварцовому дюарі з внутрішнім діаметром 4,5 мм. Об'єм проби складав 500 мл.

Статистика. Для оцінки нелінійної динаміки росту пухлин тварин використовували фактор росту та коефіцієнт гальмування пухлини згідно [6]. Статистичний аналіз вірогідності отриманих даних проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента, використовуючи комп'ютерну програму Statistica 6.0 з попередньою перевіркою гіпотези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова-Смірнова.

Результати та їх обговорення

Магніточутливий комплекс. В табл. 2 наведені

Таблиця 1

Магнітні характеристики зразків ліофілізованих тканин та препаратів

№	Об'єкт дослідження	Магнітний момент насичення m_S, емо/г	Напруженість магнітного поля для *mS* Hm_s, Е	Коерцитивна сила *Hc*, Е
1	М'язова тканина задніх кінцівок інтактних мишей	діамагнетик - 0, 00176	–	–
2	Карцинома легені Льюїс	м'який феромагнетик + 0, 18685	2000	0, 36227
3	ОФ ДР	діамагнетик - 0,200	–	–
4	ПМ ДР	парамагнетик + 0, 06836	3000	–
5	МНК	м'який феромагнетик + 11,781	12000	45,659

Таблиця 2

Вплив радіочастотної гіпертермії та магніточутливого нанокомплексу на ріст карциноми легені Льюїс

Група тварин	Серія дослідів	Параметри	
		Фактор росту φ, доби$^{-1}$	Коефіцієнт гальмування ϰ, відн. од.
1	Контроль (без ДР, МНК та РГТ)	0,262 ± 0,004	1,0
2	ОФ ДР	0,241 ± 0,003*	1,08
3	МНК + РГТ	0,221 ± 0,004*+	1,18

* – статистично значущі відмінності з рівнем значущості $p < 0,05$ порівняно з контролем

+ – статистично значущі відмінності з рівнем значущості $p < 0,05$ порівняно з ОФ ДР

Таблиця 3

Вплив радіочастотної гіпертермії та магніточутливого комплексу на процеси метастазування карциноми легені Льюїс

Група тварин	Серія дослідів	Параметри		
		Середня кількість метастазів на мишу	Середній об'єм метастазів, мм^3	Індекс інгібування метастазів
1	Контроль (без ДР, МНК та РГТ)	8,11 ± 1,86	9,54 ± 4,63	–
2	ОФ ДР	4,57 ± 1,79	3,06 ± 1,33	56,17
3	МНК + РГТ	2,17 ± 0,85*	0,65 ± 0,51*	82,16

* — статистично значущі відмінності з рівнем значущості $p < 0,05$ порівняно з контролем

Таблиця 4

Фактор росту та коефіцієнт гальмування росту карциноми легені Льюїс

Група тварин	Серія дослідів	Параметри	
		Фактор росту φ, доби$^{-1}$	Коефіцієнт гальмування ϰ, відн. од.
1	Контроль	0,34±0,001	1,00
2	ОФ ДР	0,26±0,009*	1,29
3	ПМ ДР	0,29±0,003*	1,18
4	ПМ ДР+ РГТ	0,26±0,006*	1,30

* — статистично значущі відмінності з рівнем значущості $p < 0,05$ порівняно з контролем

результати впливу МНК на ріст карциноми легені Льюїс. Аналіз отриманих результатів досліджень показав, що кінетика росту карциноми легені Льюїс носила характер нелінійного динамічного процесу. Коефіцієнт гальмування пухлин максимальний, а фактор росту мінімальний був у 3-ї групи тварин, коли використовували МНК та РГТ. У табл. 3 представлені результати комбінованого впливу на процеси метастазування. Мінімальний індекс метастазування спостерігався також у 3-й групі тварин.

Парамагнітний доксорубіцин. Виходячи з того, що основним протипухлинним фактором впливу в МНК є ПМ ДР ми провели порівняльне дослідження впливу ОФ та ПМ ДР на ріст карциноми легені Льюїс під впливом РГТ. Аналіз наведених в табл. 4 результатів свідчить, що фактор росту пухлини був мінімальний, а коефіцієнт гальмування був максимальний в 4-й групі тварин при комбінованій дії ПМ ДР та РГТ.

Радіоспектроскопія. Відомо, що цитотоксичний ефект ДР корелює з ефектом акумуляції препарату в мітохондріях [13]. Крім того компоненти МНК ДР і Fe_3O_4 володіють певними функціями, що впливають на окислювально-відновні та вільноради-

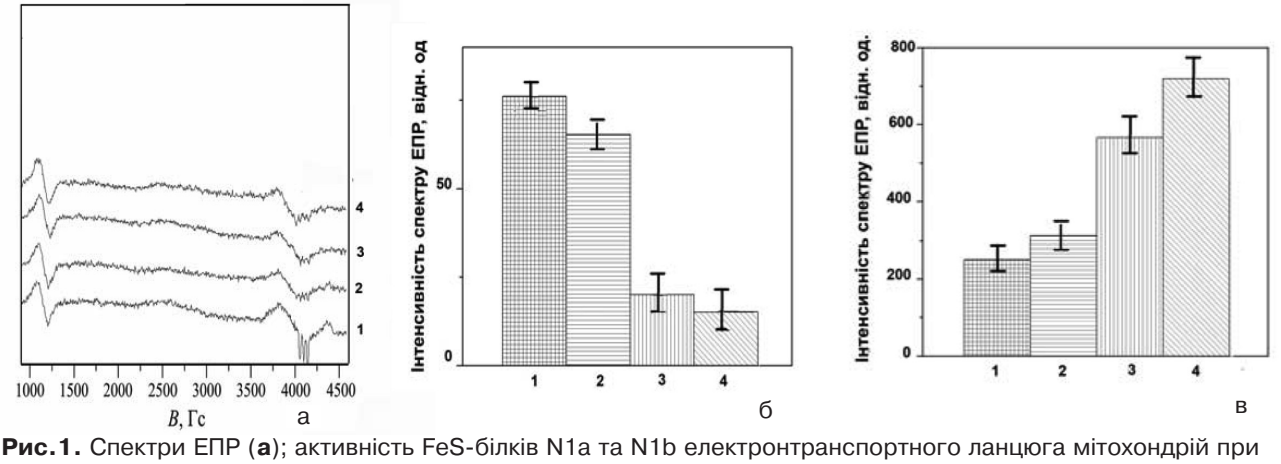

Рис.1. Спектри ЕПР (**а**); активність FeS-білків N1a та N1b електронтранспортного ланцюга мітохондрій при g=1,94 (**б**); зміни вмісту комплексів гемового та негемового заліза з оксидом азоту при g=2,03 (**в**) карциноми легені Льюїс: 1 — контроль; 2 — ДР; 3 — ДР + РГТ ; 4 — МНК + РГТ. В — магнітна індукція.

кальні процеси в пухлинних і нормальних клітинах [12]. Тому ми вивчили за допомогою методу ЕПР-спектроскопії вплив РГТ і МНК на зміну змісту комплексів негемового заліза з оксидом азоту в тканинах пухлини, печінці та нирках тварин з карциномою легені Льюїс. На рис.1 представлені ЕПР-спектри карциноми легені Льюїс. Аналіз вищенаведених результатів свідчить, що в карциномі Льюїс спостерігалося порушення процесу транспорту електронів та генерування супероксид аніон-радикалів, формування клітинної гіпоксії. Активність FeS-білків N1a та N1b електронно-транспортного ланцюга мітохондрій в експериментах при використанні МНК і РГТ була мінімальною — в 7,6 разів менше, ніж в тканинах пухлини контрольних тварин. При дії хіміопрепаратів і РГТ у всіх проведених експериментах в пухлині збільшувався вміст комплексів негемового заліза з оксидом азоту, але найбільше — в експериментах при використанні МНК і РГТ — в 2,4 рази більше, ніж в тканинах пухлини контрольних тварин. Трактування цих результатів може бути засновано на особливості змін структурної упорядкованості в електронно-транспортному ланцюзі білків-переносників у ліпідному бішарі мембран мітохондрій під впливом введеного МНК та просторово-неоднорідного опромінення електромагнітним полем [5].

Висновки

1. Для карциноми легені Льюїс притаманні властивості м'якого феромагнетику, а для м'язової тканини задніх кінцівок нормальних мишей діамагнетика. Офіцінальний доксорубіцин — діамагнетик, парамагнітний доксорубіцин — парамагнетик, магніточутливий нанокомплекс — м'який феромагнетик.
2. Комбінована дія радіочастотної гіпертермії та магніточутливого нанокомплексу на карциному легені Льюїс ініціювали також більший протипухлинний та антиметастатичний ефекти, ніж офіцінальний доксорубіцин.
3. Комбінована дія радіочастотної гіпертермії та парамагнітного доксорубіцину на карциному легені Льюїс ініціювали більший протипухлинний та антиметастатичний ефекти, ніж офіцінальний доксорубіцин.
4. Аналіз результатів радіоспектроскопії свідчить, що активність FeS-білків N1a та N1b електронтранспортного ланцюга мітохондрій була мінімальна, а зміни вмісту комплексів негемового заліза з оксидом азоту максимальні в тканинах карциноми легені Льюїс під впливом радіочастотної гіпертермії та магніточутливого нанокомплексу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Коновалова Н.П., Дьячковская Р.Ф., Волкова Р.М., Кагия В.Т. Потенцирование антиметастатической активности циклофосфана радиосенсибилизатором АК-2123 // Экспериментальная онкология. — 1994. — № 16. — С. 419-422.
2. Мовчан Б.А. Электронно-лучевая нанотехнология и новые материалы в медицине — первые шаги // Вісн. фармакол. і фармації. — 2007. — № 12. — С. 5-13.
3. Орел В.Е., Шевченко А.Д. Мельник Ю.Г. та ін. Фізіко-хімічні характеристики магніточутливого нанокомплексу, отриманого з використанням механомагнетохімічної технології сухого синтезу // Металлофизика и новейшие технологии. — 2010. — Т. 32, № 9. — С. 1157-1167.
4. Резников О. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісн. НАН України. — 2001. — № 1. — С. 5-7.
5. Самойлов В.О. Медицинская биофизика. СПб.: СпецЛит., 2007. — 560 с.
6. Эмануэль Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. — Москва: Наука, 1977. — 419 с.
7. Giuliani F.C., Kaplan N.O . New doxorubicin analogs active against doxorubicin-resistant colon tumor xenografts in the nude mouse // Cancer research. — 1980. — Vol. 40. — P. 4682 — 4687.
8. Orel V.E., Romanov A.V., Dzyatkovska I.I., Nikolov M.O., Mel'nik Y.G., Dzyatkovska N.M., Shchepotin IB. The effect of mechano- and magnetochemically synthesized magnetosensitive nanocomplex and electromagnetic irradiation on animal tumor // II Mediterranean conference on medical and biological engineering and computing 2010. Springer, Berlin, IFMBE Proceedings. — 2010. — Vol. 29. — P. 510-512.
9. Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine // Topical Review. Phys D: Appl Phys.- 2003. — Vol. 36.- P.167-181.
10. Roca A.G., Costa R., Rebolledo A.F., Veintemillas-Verdaguer S., Tarttaj P, Gonzalez-Carreno T., Morales M.P., Serna C.J. Progress in preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine // J Phys D Appl Phys . — 2009. — Vol. 42 — P. 1-11.
11. Thiesen B., Jordan A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia // Int J Hyperthermia. — 2008.- Vol. 24. — P. 467- 474.
12. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. — 2007. — Vol. 39. — P. 44-84.
13. Xiong XB, Ma Z, Lai R, Lavasanifar A. The therapeutic response to multifunctional polymeric nano-conjugates in the targeted cellular and subcellular delivery of doxorubicin // Biomaterials. — 2010.- Feb; Vol. 31, №4. — P. 757-768.

РЕЗЮМЕ. Комбинированное действие радиочастотной гипертермии и магниточувствительного нанокомплекса на животных с карциномой легкого Льюис инициирует больший противоопухолевый и антиметастатический эффекты, чем официнальный доксорубицин. При этом активность FeS-белков N1a и N1b электронтранспортной цепи митохондрий была минимальна, а изменения содержания комплексов негемового железа с оксидом азота максимальны в тканях карциномы легкого Льюис под влиянием радиочастотной гипертермии и магниточувствительного нанокомплекса.
Ключевые слова: карцинома легкого Льюис, радиочастотная гипертермия, магниточувствительный нанокомплекс, доксорубицин.

SUMMARY. Cumulative effect of radio frequency hyperthermia and magneto-sensitive nanocomplex initiated increased of antitumor and antimetastatic effects than conventional doxorubicin. An radiospectroscopy shows that the activity of FeS-protein N1a and N1b electron transport chain of mitochondria was minimal, and increasing the content of nonhemo iron complexes with nitrogen oxide in the tissues of Lewis lung carcinoma under the influence of radio frequency hyperthermia and magneto-sensitive nanocomplex.
Key words: Lewis lung carcinoma, radio frequency hyperthermia, magneto-sensitive nanocomplex, doxorubicin.