

В. Е. Орел, А. Д. Шевченко, І. І. Дзятковська, М. О. Ніколов,  
А. В. Романов, А. Ю. Рихальський, А. П. Бурлака, С. М. Лукін,  
Н. М. Дзятковська, І. Б. Щепотін

## Порівняльний аналіз магнітних характеристик та протипухлинного ефекту наноконкомплексів з наночастинок оксидів заліза та доксорубіцину при радіочастотній гіпертермії карциносаркоми Уокер-256

(Представлено членом-кореспондентом НАН України В. Л. Ганулом)

*Проведене порівняльне дослідження магнітних характеристик за допомогою методу магнітометрії на вібраційному магнітометрі та спектрів електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) наноконкомплексів з наночастинок  $Fe_2O_3$ ,  $Fe_3O_4$  і протипухлинного антибіотика доксорубіцину засвідчило, що зміни магнітних моментів насичення були подібними до змін інтегральної інтенсивності спектрів ЕПР. Найбільші магнітні моменти насичення та інтегральні інтенсивності спектрів ЕПР мали зразки з наночастинками  $Fe_3O_4$ , які в складі наноконкомплексу з доксорубіцином виявляли максимальний протипухлинний ефект при радіочастотній гіпертермії карциносаркоми Уокер-256.*

Значні зусилля дослідників у онкології в даний час зосереджені на розробці наноконкомплексів (НК) на основі синтезу біосумісних багатofункціональних наночастинок, які поєднуються з цитостатичними препаратами і вводяться пацієнтові через кровоносну систему. НК, мають додаткові переваги порівняно з традиційним прийомом препаратів через їх здатність інтегруватися з різноманітними речовинами за рахунок високої питомої поверхні [1]. НК, синтезовані на основі наночастинок магнетиту ( $Fe_3O_4$ ) або маггеміту ( $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ ) з протипухлинним антибіотиком доксорубіцином (ДР), можуть бути використані як протипухлинні агенти при радіочастотній гіпертермії (РГТ) [2].

Основні проблеми, які гальмують широке впровадження в клінічну практику комплексного лікування онкологічних хворих з використанням магніточутливих НК при РГТ, можуть бути зведені до нижченаведеного переліку: незначна поверхнева селективність наночастинок поміж злоякісними та нормальними клітинами; РГТ, що ініційована електромагнітним опроміненням (ЕО) злоякісних пухлин, при температурах понад  $41\text{ }^\circ\text{C}$  може супроводжуватись формуванням термотолерантності та терморезистентності на клітинному рівні внаслідок ініціювання синтезу білків теплового шоку; сповільнена біодеструкція наночастинок в організмі та побічні ефекти накопичення їх у печінці, селезінці, м'язах, інших органах [3]. Таким чином, можна констатувати, що вирішення зазначених проблем при ініціюванні електромагнітним полем протипухлинної активності речовин на наноосіях є актуальною задачею.

Одним з підходів вирішення вищезазначених проблем є концепція, запропонована А. Сент-Дьйорді стосовно впливу ефекту переносу електронів у клітині на інтенсивність

росту злоякісних пухлин [4]. Відомо, що оксид заліза  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  є найбільш стійкою кисневмісною сполукою заліза, а оксид заліза  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) — навпаки, більш легко окислюється, є хорошим провідником струму та має більшу величину окисно-відновного стандартного електродного потенціалу [5]. Магнітні поля можуть впливати на кінетику окисно-відновних реакцій радикалів із сполуками перехідних металів, які мають різну електронну конфігурацію [6]. Наночастинки оксидів заліза включають у свій склад іони з неспареними електронами на внутрішній оболонці (наприклад  $3d$  оболонка іонів  $\text{Fe}$  у  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), які обумовлюють магнітні властивості магнетиту. В процесі утворення НК, в склад якого входить ДР, виникають умови переходу електрона між внутрішніми та частково заповненими зовнішніми орбіталями, що призводить до зміни реакційної здатності НК [7]. Під час РГТ НК у злоякісних пухлинах виникають вихрові струми та магнітні вихри, які впливають на кінетику окисно-відновних реакцій за участю радикалів між НК та злоякісними клітинами. Механізм цитотоксичної дії ДР за участю іонів заліза заснований на активації гідроксильних радикалів, які руйнують ліпіди, білки, ДНК та інші компоненти і структури пухлинних клітин [8]. Це ініціює процеси апоптозу та некрозу пухлинних клітин, змінюючи кінетику їх росту, яка, вірогідно, може залежати від типу сполуки заліза з киснем у НК.

Ми ставили за мету дослідити на тваринах з карциномосаркомою Уокер-256 особливості протипухлинного ефекту при введенні НК з наночастинок  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  або  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  та ДР і помірній РГТ.

Як самостійні частини або складові препаратів були використані наночастинки оксиду заліза  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  та  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  діаметром  $<50$  нм ("Sigma") і ДР виробництва Пфайзер Італія С. р. л., Італія. Масова концентрація ДР у НК — 50%. Механомагнетохімічну активацію (ММХА) та механомагнетохімічний синтез (ММХС) при одночасній дезінтеграції частинок і ЕО порошку в сухому вигляді проводили за допомогою механомагнітного реактора "ММР1" (НІР) [9]. Локалізацію НК в пухлині здійснювали за допомогою постійного неодимового магніту, величина магнітної індукції якого на поверхні в центрі становила 0,3 Тл. Для локального просторово-неоднорідного ЕО використовували прототип апарата "Магнітерм" ("Радмір", Україна). Параметри ЕО: частота — 40 МГц, вихідна потужність — 60 Вт. Аплікатор апарата — рамковий, з розмірами  $2 \times 2,5$  см та профілем у формі дуги з радіусом кривизни 2,3 см.

Магнітні характеристики препарату досліджували методом магнітометрії на вібраційному магнітометрі "Vibrating Magnetometer 7404 VSM" ("Lake Shore Cryotronics, Inc.", США) в магнітних полях з напруженістю до 13 кЕ. Чутливість магнітометра становила  $10^{-7}$  емо, що давало можливість виконувати виміри магнітного моменту на зразках масою до одиниць міліграм. Масу досліджуваних зразків визначали за допомогою електронних мікроваг АВ135-S/ФАСТ з автокомпенсацією ("METTLER TOLEDO", Швейцарія). Чутливість ваг становила  $10^{-5}$  г.

Для дослідження стабільних вільних радикалів досліджували спектри електронного парамагнітного резонансу (ЕПР), які реєстрували на модернізованому спектрометрі марки РЕ1307 (ЗЕПС АН) при температурі рідкого азоту 77 К в циліндричному резонаторі з модою Н011 на частоті близько 9,15 ГГц. Потужність надвисокочастотного випромінювання становила 40 мВт. Використовували модуляцію магнітного поля частотою 100 кГц. Пробу розміщували у кварцовому дьюарі з внутрішнім діаметром 4,5 мм. Об'єм проби становив 0,5 мл.

Дослідження впливу НК, ДР та РГТ тварин на протипухлинну активність комплексу проведено на 48 неінбредних щурах-самках масою  $(180 \pm 15)$  г розводки віварію Національ-

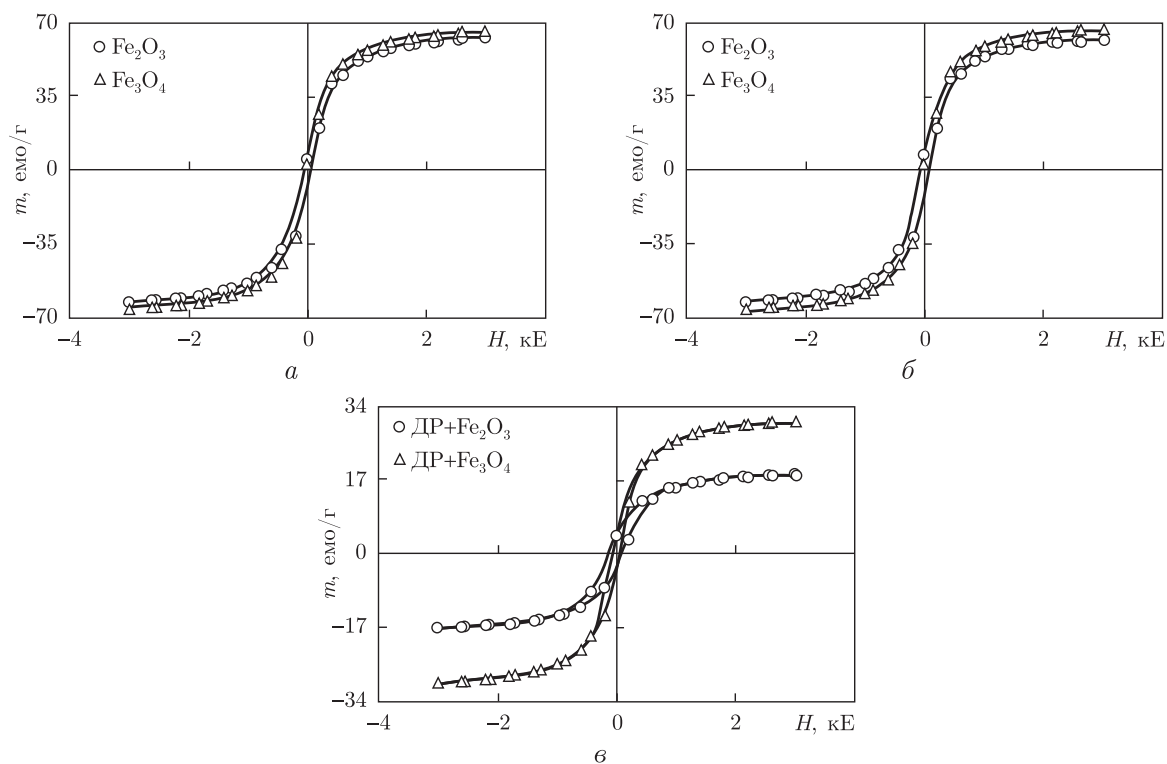


Рис. 1. Петлі гістерезису при 300 К. *a* — без впливу; *б* — після ММХА; *в* — після ММХС

ного інституту раку з перещепленою карциносаркомою Уокер-256. Трансплантацію пухлинних клітин карциносаркоми Уокер-256 здійснювали шляхом введення щурям у праве стегно 20% суспензії клітин в об'ємі 0,4 мл в середовищі 199. ДР вводили тваринам у дозі 1,5 мг/кг маси, НК — ДР 1,5 мг/кг,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  або  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  3 мг/кг. РГТ і введення препаратів у хвостову вену тварин об'ємом 0,3 мл в розчині NaCl починали на 4-ту добу після перещеплення пухлини і проводили 1 раз у 2 доби. Весь курс складався з 5 ін'єкцій та 5 сеансів РГТ. Строк спостереження за тваринами становив 20 діб.

Внутрішньопухлинна температура не перевищувала 37,9 °С. Об'єм пухлини заміряли і розраховували як описано в роботі [10].

Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно з нормами, встановленими законом України № 3447-IV „Про захист тварин від жорстокого поводження”, а також прийнятими в Європейській конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей від 20.09.1985 [11].

Для оцінки нелінійної динаміки росту пухлин тварин використовували фактор росту  $\varphi$  та коефіцієнт гальмування пухлини  $\kappa$  згідно з [12].

Статистичний аналіз вірогідності отриманих даних проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента з попередньою перевіркою гіпотези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова–Смірнова.

Аналіз магнітних характеристик (рис. 1, табл. 1) свідчить про те, що магнітний момент насичення ( $m_s$ ) для зразків  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  без впливу і після ММХА був на 4 і 7% відповідно більший, ніж для зразків  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Після ММХС магнітний момент насичення НК на основі ДР з  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  перевищував цей параметр для НК на основі ДР з  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  на 72%.

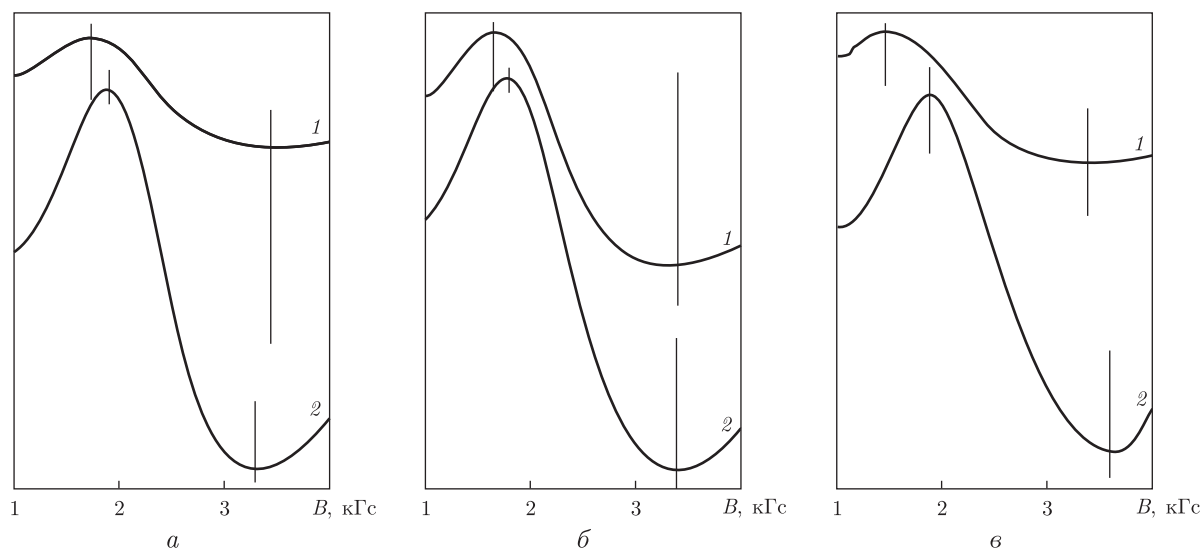


Рис. 2. Спектри ЕПР: *a* – без впливу; *б* – ММХА; *в* – ММХС; 1 – Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 2 – Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

На рис. 2 наведені спектри ЕПР досліджених зразків, а в табл. 2 – фактори спектроскопічного розщеплення  $g$  та інтегральної інтенсивності спектрів ЕПР. Відзначимо, що в досліджених зразках зміни інтегральної інтенсивності спектрів були подібними до змін магнітних моментів насичення. Так, після ММХА та ММХС інтегральна інтенсивність

Таблиця 1. Магнітні характеристики зразків

Серія досліджу	Магнітний момент насичення ( $m_s$ ), емо/г	Напруженість магнітного поля ( $H$ ), Е для $m_s$	Коерцитивна сила ( $H_c$ ), Е
ДР офіційний (без впливу), діаманетик, $m = -0,200$ емо/г	—	—	—
ДР (ММХА), парамагнетик, $m = +0,06836$ емо/г	—	3000	—
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (без впливу)	63,243	3000	45,3
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (без впливу)	65,963	3000	22,3
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (ММХА)	61,893	3000	57,1
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (ММХА)	66,422	3000	40,1
НК [ДР + Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (ММХС)]	17,567	3000	110,5
НК [ДР + Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (ММХС)]	30,265	3000	42,8

Таблиця 2. Зміни  $g$ -фактору та інтегральної інтенсивності спектрів ЕПР наноконпозита та оксидів заліза після механомагнітного впливу

Серія досліджу	$g$ -фактор			Інтегральна інтенсивність спектрів ЕПР, відн. од.		
	Контроль (без обробки)	ММХА	ММХС	Контроль (без обробки)	ММХА	ММХС
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2,71	2,79	—	1	1,02	—
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + ДР	—	—	2,84	—	—	0,75
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	2,66	2,70	—	1	2,11	—
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> + ДР	—	—	2,70	—	—	1,8

Таблиця 3. Вплив наноконкомплексів з доксорубіцину та оксидів заліза при радіочастотній гіпертермії на нелінійну динаміку росту карциносаркоми Уокер-256

Група тварин	Серія досліджу	Фактор росту пухлини ( $\varphi$ ), доба <sup>-1</sup>	Коефіцієнт гальмування росту пухлини ( $\kappa$ ), відн. од.
1	Контроль	0,592 ± 0,017	1,00
2	ОФ ДР	0,474 ± 0,009 <sup>1</sup>	1,25
3	ОФ ДР + РГТ	0,465 ± 0,007 <sup>1</sup>	1,28
4	НК [ДР+Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] + РГТ	0,518 ± 0,012 <sup>1,2,3</sup>	1,14
5	НК [ДР+Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] + РГТ	0,448 ± 0,012 <sup>1,4</sup>	1,32
6	НК [ДР+Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] + РГТ	0,479 ± 0,005 <sup>1,4,5</sup>	1,24

<sup>1</sup>Статистично значущі відмінності порівняно з контролем з рівнем значущості  $p < 0,05$ .

<sup>2,3,4,5</sup>Статистично значущі відмінності порівняно з 2, 3, 4, 5 групами тварин з рівнем значущості  $p < 0,05$ .

спектрів зразків з Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> була істотно вищою. За умов ММХС фактор спектроскопічного розщеплення  $g$  зростає до величини 2,84 для наноконкомпозита Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> з ДР. Після ММХА та ММХС Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> підвищувався з 2,66 до 2,70. Це свідчить про можливі зміни в їх електронних структурах.

В табл. 3 наведені результати впливу НК та РГТ на нелінійну динаміку росту карциносаркоми Уокер-256 з 7-ї по 20-ту добу після перещеплення. Згідно з одержаними даними, найбільший протипухлинний вплив на динаміку росту карциносаркоми Уокер-256 спостерігався при введенні НК з ДР і Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> та подальшій РГТ, а найменший — при введенні НК з ДР і Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> й подальшій РГТ. Введення НК з ДР та Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> й подальша РГТ ініціювали проміжний ефект гальмування росту пухлини.

Отримані результати свідчать про те, що магнітні властивості ММХС НК й протипухлинний ефект були найбільшими при використанні протипухлинного НК на основі наночастинок Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Механізм цього процесу полягає у впливі магнітних полів на окисно-відновні вільнорадикальні реакції та процеси переносу електронів в електрон-транспортних ланцюгах мітохондрій [13]. В прикладному аспекті це свідчить про наявність більшого потенційного ефекту магнетиту як складової протипухлинного НК, ніж маггеміту, принаймні з двох причин. Перша — це підвищення можливості цілеспрямованої доставки та локалізації в пухлині НК на основі Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> постійним магнітним полем. Друга, як це було раніше встановлено [14], — ініціація ЕО та НК порушень в електрон-транспортних ланцюгах мітохондрій при тотальному лізисі крист. Це було обумовлено максимальним вмістом комплексів негемового заліза з оксидом азоту. При цьому підвищилась індукція апоптозу і некрозу злоякісних пухлин та гальмування їх росту.

1. Roca A. G., Costa R., Rebollo A. F. et al. Progress in preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine // J. Phys. D. Appl. Phys. — 2009. — **42**. — P. 1–11.
2. Nedelcu G. Magnetic nanoparticles impact on tumoral cells in the treatment by magnetic fluid hyperthermia // Dig. J. Nanomater. and Biostruct. — 2008. — **3**, No 3. — P. 103–107.
3. Maier-Hauff K., Rothe R., Scholz R. et al. Intracranial Thermotherapy using Magnetic Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy: Results of a Feasibility Study on Patients with Glioblastoma Multiforme // J. Neuro-Oncol. — 2006. — **81**, No 1. — P. 53–60.
4. Сент-Дьєрди А. Биоэлектроника. Исследование в области клеточной регуляции, защитных механизмов и рака. — Москва: Мир, 1971. — 80 с.
5. Harris L. A. Polymer Stabilized Magnetite Nanoparticles and Poly(propylene oxide) Modified Styrene-Dimethacrylate Networks: Dis. — Blacksburg, Virginia, 2002. — 161 p.

6. Худяков И. В., Кузьмин В. А. Окислительно-восстановительные реакции свободных радикалов // Успехи химии. — 1978. — 1. — С. 39–82.
7. Symons M., Gutteridge J. Free Radicals and Iron: Chemistry, Biology, and Medicine. — Oxford: Oxford Univ. Press, 1998. — 242 p.
8. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E. et al. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity // Luca Gianni. Pharmacol Rev. — 2004. — 56, No 2. — P. 185–229.
9. Орел В. Э., Шевченко А. Д., Мельник Ю. Г. и др. Физико-химические характеристики магниточувствительного наноконплекса, полученного с использованием механомагнетохимической технологии сухого синтеза // Металлофизика и новейшие технологии. — 2010. — 32, № 9. — С. 1157–1167.
10. Giuliani F. C., Kaplan N. O. New doxorubicin analogs active against doxorubicin-resistant colon tumor xenografts in the nude mouse // Cancer Res. — 1980. — 40. — P. 4682–4687.
11. Резников О. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісн. НАН України. — 2001. — № 1. — С. 5–7.
12. Эмануэль Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. — Москва: Наука, 1977. — 419 с.
13. Бучаченко А. Л., Сагдеев Р. З., Салихов К. М. Магнитные и спиновые эффекты в химических реакциях. — Новосибирск: Наука, 1978. — 208 с.
14. Орел В. Э., Щепотин И. Б., Смоленка И. И. и др. Радиочастотная гипертермия злокачественных новообразований, нанотехнологии и динамический хаос. — Тернополь: ТПМУ, Укрмедкнига, 2012. — 448 с.

Національний інститут раку, Київ  
 Інститут металофізики ім. Г. В. Курдюмова  
 НАН України, Київ  
 Інститут експериментальної патології,  
 онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького  
 НАН України, Київ

Надійшло до редакції 25.06.2012

**В. Э. Орел, А. Д. Шевченко, И. И. Дзятковская, Н. А. Николов,  
 А. В. Романов, А. Ю. Рыхальский, А. П. Бурлака, С. Н. Лукин,  
 Н. Н. Дзятковская, И. Б. Щепотин**

**Сравнительный анализ магнитных характеристик  
 и противоопухолевого эффекта наноконплексов из наночастиц  
 оксидов железа и доксорубицина при радиочастотной гипертермии  
 карциносаркомы Уокер-256**

*Проведенное сравнительное исследование магнитных характеристик с помощью метода магнитометрии на вибрационном магнитометре и спектров электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) наноконплексов из наночастиц Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и противоопухолевого антибиотика доксорубицина показало, что изменения магнитных моментов насыщения были подобны изменениям интегральной интенсивности спектров ЭПР. Наибольшие магнитные моменты насыщения и интегральные интенсивности спектров ЭПР имели образцы с наночастицами Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, которые в составе наноконплекса с доксорубицином обладали максимальным противоопухолевым эффектом при радиочастотной гипертермии карциносаркомы Уокер-256.*

V. E. Orel, A. D. Shevchenko, I. I. Dzyatkovskaya, N. A. Nikolov,  
A. V. Romanov, A. Y. Rihalsky, A. P. Burlaka, S. N. Lukin,  
N. N. Dzyatkovskaya, I. B. Schepotin

**Comparative analysis of magnetic properties and the antitumor effect  
of nanocomplexes from nanoparticles of iron oxides and doxorubicin  
during radiofrequency hyperthermia of Walker 256 carcinosarcoma**

*A comparative study of magnetic properties with the use of the method of magnetometry with a vibration magnetometer and electron paramagnetic resonance (EPR) spectra of nanocomplexes of nanoparticles  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and antitumor antibiotic doxorubicin has shown that the changes in the saturation magnetic moments are similar to the changes in the integral intensity of EPR spectra. The greatest magnetic moments of saturation and the integral intensity of EPR spectra are characteristic samples of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  in a nanocomplex with doxorubicin, which has the highest antitumor effect in radiofrequency hyperthermia of Walker 256 carcinosarcoma.*