

УДК: 621.039.85:615.84:616-006

В.Е. Орел, д-р біол. наук, М.О. Ніколов, канд. техн. наук, І.І. Дзятковська, А.В. Романов, канд. техн. наук, Н.М. Дзятковська, канд. біол. наук, О.Ю. Ярошенко, А.В. Макаренко

Радіочастотна протипухлинна терапія тварин з карциносаркомою Уокер-256

Після проведення радіочастотної протипухлинної терапії просторово-неоднорідним електромагнітним полем з використанням офіційного доксорубіцину отримано найбільший коефіцієнт гальмування кінетики росту пухлини тварин з карциносаркомою Уокер-256 в порівнянні з магніточутливим наноконкомплексом Fe_3O_4 з KCl й доксорубіцином. За даними сцинтиграфічних (СЦ) досліджень просторово-неоднорідне електромагнітне поле підвищує кровотік у всьому тілі та пухлині тварини, що дає можливість локально візуалізувати наноконкомпозит з наночасток Fe_3O_4 з KCl та радіофармпрепарату у карциносаркомі Уокер-256.

The greatest tumor growth inhibition was observed for animals with Walker carcinosarcoma 256 after radiofrequency antitumoral therapy by spatially inhomogeneous electromagnetic field with officinal preparation doxorubicin. According to the scintigraphic studies spatially inhomogeneous electromagnetic field increased blood flow throughout the body and tumor animal, enabling locally visualize nanocomposite Fe_3O_4 nanoparticles with KCl and radiopharmaceutical in Walker-256 carcinosarcoma.

Вступ

Для злякисної пухлини та її мікрооточення характерними явищами є хаотичність судинної мережі, існування просторово-часової гетерогенності в розвитку і ступені вираженості пухлинної гіпоксії, нестабільності генома, помітна гетерогенність вмісту АТФ та інших метаболітів [1].

Локальна синергетична радіочастотна протипухлинна терапія (РПТ) з використанням наноконкомпозиту (НК) сама по собі не може бути чинником, що лімітує злякисний процес, а використовується як неoad'ювантний та ад'ювантний метод при комбінованому лікуванні онкологічних хворих. Комбіновані методи лікування онкологічних хворих з використанням РПТ мають як локальний вплив на злякисну пухлину, так і загальний вплив на організм-пухлиноносія, але завжди мають певні обмеження в адитивних і синергетичних ефектах при терапії [2]. Такі обмеження, ми вважаємо, обумовлені патофізіологі-

чними обмеженнями параметрів системи при хаотичній динаміці на різних ієрархічних рівнях під час онкогенезу [3]. Використання концепції динамічного хаосу дає можливість розробляти принципово нові стратегії просторово-неоднорідної РПТ, при якій можлива ефективніша корекція кінетики ферментативних та вільнорадикальних реакцій.

Метою даної роботи було дослідження впливу радіочастотної протипухлинної терапії та наноконкомпозиту Fe_3O_4 з KCl і доксорубіцину на кінетику росту карциносаркоми Уокер-256 та виживаність тварин-пухлиноносіїв.

Матеріали та методи

Магніточутливий наноконкомпозит. В роботі використовували наночастинки оксиду заліза Fe_3O_4 з KCl, діаметром 20 – 40 нм, отриманих з застосуванням технології електронно-променевого випаровування та конденсації у вакуумі неорганічних матеріалів [4]. НК для РПТ Fe_3O_4 з KCl й протипухлинним антрацикліновим антибіотиком доксорубіцином (ДР) (Пфайзер Італія С.Р.Л., Італія) отримували за допомогою механомагнетохімічної технології сухого синтезу [5]. Проводили сухий синтез 3 мг Fe_3O_4 з KCl та 1,5 мг ДР.

Для дослідження кінетики накопичення наночастинок та гемодинамічних змін в пухлині під впливом РПТ використовували НК на основі Fe_3O_4 та KCl й ^{99m}Tc -пірфотех. В цьому випадку НК отримували за допомогою технології механохімічного сухого синтезу 3 мг Fe_3O_4 з KCl та вмісту флакону пірфотех («Радіопрепарат», Узбекистан). Після механохімічного синтезу Fe_3O_4 з KCl та пірфотех отриманий НК розчиняли у 2 мл елюату ^{99m}Tc («Радіопрепарат», Узбекистан) з питомою активністю 150 ± 8 МБк/мл.

Тварини та трансплантація пухлини. В досліді були використані 52 неінбредних щурів-самок вагою (100 ± 15) г розводки віварію Національного інституту раку з перещепленою карциносаркомою Уокера. Трансплантацію пухлинних клітин карциносаркоми Уокер 256 здійснювали введенням щурам в праве стегно 30 % суспензії клітин в об'ємі 0,4 мл в середовищі 199.

Тварини були розділені на 5 груп: 1 група – контроль (без введення ДР і електромагнітного опроміювання (ЕО) ($n = 21$); 2 група – введення

ДР (n = 10); 3 група – введення ДР і ЕО (n = 7); 4 група – введення НК (без термообробки Fe₃O₄) і ЕО (n = 7); 5 група – введення НК (термообробка Fe₃O₄ 200 °С) і ЕО (n = 7).

Введення ДР тваринам проводили в масовій концентрації 1,5 мг/ кг ваги тварини НК: ДР – 1,5 мг/кг, Fe₃O₄ – 3 мг/кг. Введення ДР та НК здійснювали в об'ємі 0,3 мл у розчині NaCl у хвостову вену тварини. Внутрішньовенне введення препаратів та ЕО починали на 3 день після перещеплення пухлини і проводили 1 раз в 2 доби. Весь курс складався з 5 ін'єкцій і/або 5 сеансів ЕО.

Магнітна локалізація наноконструкту та радіочастотна протипухлинна терапія. Під час введення НК і одразу після введення протягом 10 хв для локалізації НК в зоні пухлини розташовували постійний магніт з магнітною напруженістю 1990 А/м.

Наступне зовнішнє локальне ЕО просторово-неоднорідним ЕМП пухлини проводили протягом 15 хв за допомогою прототипу апарата «Магнітерм» на частоті 40 МГц при вихідній потужності 100 Вт. При цьому внутрішньопухлинна температура, характерна для помірної гіпертермії не перевищувала 37,9 °С.

Сцинтиграфічне дослідження. СЦ дослідження проводили за допомогою томографічної гама-камери ГКС-301Т (Україна) з низькоенергетичним коліматором високої чутливості. Детектор гама-камери розташовували на відстані 10 см від тварини. СЦ зображення отримували зі сторони спини тварини. Матриця збору інформації – 256 × 256, 16 біт. Обробку сцинтиграфічних зображень здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Spect Work» (Україна).

3 метою виявлення впливу ЕО на підвищення кровотоку в організмі та в пухлині тварин проводили СЦ дослідження з радіофармпрепаратом (РФП) ^{99m}Tc-технетрил («Радіопрепарат», Узбекистан). Тваринам вводили 0,1-0,15мл ^{99m}Tc-технетрил з активністю 45 ± 5 МБк. Для безпосереднього підтвердження локалізації НК в пухлині

використовували сцинтиграфічну візуалізацію карциносаркоми Уокер-256 за допомогою НК на основі ^{99m}Tc-пірфотех з Fe₃O₄ та KCl.

Біоетика. Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно з 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.

Статистика. Для оцінки нелінійної динаміки росту пухлин тварин використовували фактор росту φ та коефіцієнт гальмування пухлини κ згідно [6]. 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. Виживаність хворих оцінювали за методом Каплана-Мейєра [ВООЗ, 1998]. Розбіжності між кривими виживаності аналізували за допомогою long-rank тесту. Для аналізу даних використовували пакети прикладних програм Statistica 6.0 та Prism 4.0.

Результати

Кінетика росту карциносаркоми Уокер-256. Результати вивчення впливу ДР, НК і ЕО на ріст карциноми Уокер протягом 16 діб після перещеплення представлені в табл. 1. Аналіз наведених даних свідчить, що фактор росту φ пухлини для тварин 2, 3 та 4-ої груп був в середньому на 39 % менший, ніж в 1-ій контрольній групі. Максимальний коефіцієнт гальмування κ був у 3-ій групі й дорівнював 1,71 відн.од. Слід відмітити, що застосування при РПТ НК, в склад якого входили наночастинки Fe₃O₄ з KCl, що були попередньо піддані термообробці до 200 °С, ініціювали найбільший фактор росту φ = 0,35 ± 0,01 доби⁻¹ та найменший коефіцієнт гальмування κ=1,54 відн. од.

Таблиця 1. Кінетика росту карциносаркоми Уокер-256

№, група тварин	Параметри	
	Фактор росту φ, доби ⁻¹	Коеф. гальмування κ, відн. од.
1. Контроль(без ДР,НК та ЕО)	0,54 ± 0,04	
2. Введення ДР	0,33 ± 0,02	1,65
3. Введення ДР і ЕО	0,32 ± 0,01	1,71
4. Введення НК (без термообробки Fe ₃ O ₄ з KCl) і ЕО	0,34 ± 0,01	1,59
5. Введення НК термообробки Fe ₃ O ₄ з KCl при 200 °С) і ЕО	0,35 ± 0,01 ⁺	1,54

Примітка. – Статистично значущі відмінності порівняно з контролем з рівнем значущості p < 0,05;

⁺ – Статистично значущі відмінності порівняно з групою 3 (введення ДР і ЕО) з рівнем значущості p < 0,05.

Вживаність тварин з карциносаркомою Уокер-256. Вживаність тварин спостерігали протягом 53 діб (рис. 1). Слід відмітити, що на 21 добу після перещеплення пухлини всі тварини контрольної групи загинули. Динаміка вживаності в групах свідчить, що статистично значима різниця згідно log-rank тесту з рівнем значущості $p < 0.005$ спостерігалась лише між контрольною та всіма іншими групами тварин, що досліджувались. Вживаність тварин у 2–4 групах згідно log-rank тесту статистично достовірно не відрізнялась.

Результати кінетики росту карциносаркоми Уокер-256 та вживаності тварин-пухлиноносіїв мають спільну тенденцію, але саме з них формується уявлення про найбільш ефективний результат при проведенні РПТ з офіційальним ДР, який підтверджує раніше отримані результати [7]. Використання НК при РПТ мало тенденцію до ініціювання дещо меншого протипухлинного ефекту та тривалості життя тварин. Це було обумовлено, на наш погляд, тим, що частина ДР залишилася у зв'язаному з Fe_3O_4 стані в НК при РПТ. Підтвердженням цього є раніше проведені нами спектроскопічні дослідження десорбції ДР від НК.

Слід звернути увагу і на отриманий на перший погляд негативний результат – найменший протипухлинний ефект РПТ при використанні НК з термообробленого Fe_3O_4 та KCl при 200 °C та ДР. Фізико-хімічна інтерпретація цього ефекту при порівнянні з експериментами коли використовували НК без термообробки Fe_3O_4 з KCl та ДР вірогідно свідчить про наступне. Внаслідок термообробки на поверхні оксиду заліза відбулася дисоціація гідроксил-радикалу OH^\bullet [8], який є важливим чинником ефективності дії НК з ДР при РПТ [9]. В послідовних наших вже позитивних результатах експериментів була під-

верджена фундаментальна роль процесів вільнорадикального окислення в цитотоксичних ефектах РПТ на експериментальному пухлинному процесі карциноми Льюїс.

Сцинтиграфічне дослідження. Аналізуючи отримані СЦ зображення карциносаркома Уокер-256 з туморотропним препаратом ^{99m}Tc -технетрил (без НК) без та після ЕО (рис. 2 а,б) слід відмітити, що накопичення РФП через 60 хв після введення та локального ЕО було на 20% більше в пухлині, в той час як кліренс крові у всьому тілі тварини підвищувався майже на 9% порівняно з тваринами з контрольної групи, які не зазнали жодного впливу. Артеріальний приток ^{99m}Tc -технетрил в пухлину після ЕО підвищився на 11 % у порівнянні з контрольною групою. Ці данні свідчать, що під впливом просторово-неоднорідного ЕМП підвищується кровотік не лише в пухлинні, а й в усьому тілі тварини.

СЦ дослідження кінетики НК ^{99m}Tc -пірфотех й Fe_3O_4 з KCl також засвідчили, що попереднє ЕО пухлини збільшувало накопичення в ній препарату майже в 2 рази з дифузійно-нерівномірним розподілом (рис. 3 а, б). Дифузійний розподіл НК в проекції пухлини, на наш погляд, може бути обумовлений характерною гетерогенністю структури пухлинної тканини й дискретним розподілом локалізованих в них наночастинок. Отримані данні свідчать про локальне накопичення в карциносаркомі Уокер-256 частини внутрішньовенно введеного магніточутливого НК. Слід зазначити, що використаний офіційальний ^{99m}Tc -пірфотех, як і наночастинок Fe_3O_4 з KCl не володіють специфічною тропністю до пухлинних клітин. Вони найбільше накопичуються в печінці, нирках та інших органах [10]. За оціночними даними, не більш 15% ^{99m}Tc -пірфотех знаходилось у зв'язаному стані з наночастинками Fe_3O_4 з KCl.

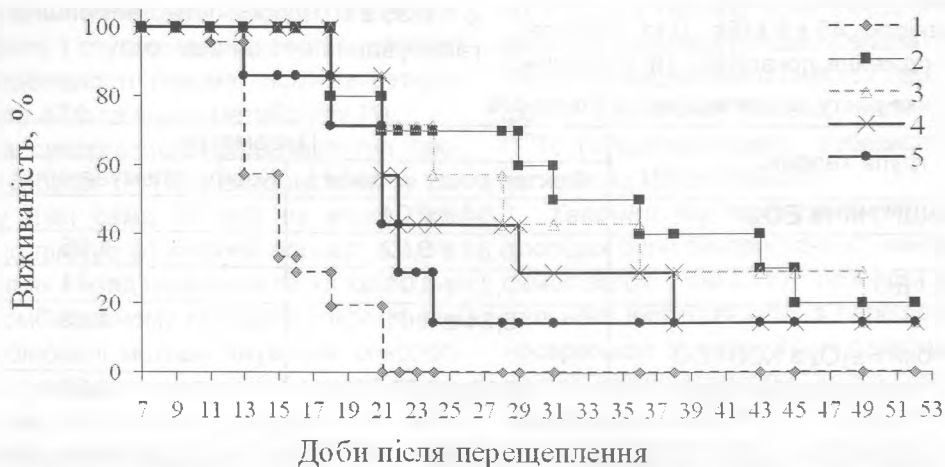


Рис. 2. Вплив введення НК та ЕО на кінетику вживаності тварин з карциносаркомою Уокер-256: 1 – контроль; 2 – введення ДР; 3 – введення ДР і ЕО; 4 – введення НК (без термообробки Fe_3O_4 з KCl) і ЕО; 5 – введення НК (термообробка Fe_3O_4 з KCl при 200 °C) і ЕО.

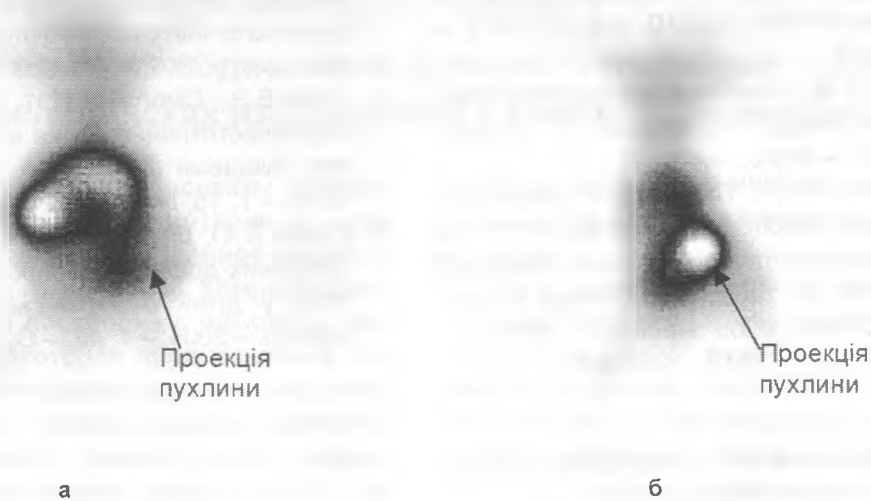


Рис. 2. Сцинтиграфічні зображення тварин з туморотропним ^{99m}Tc -технетрил на 120 хв після внутрішньовенного введення препарату: а – без попереднього ЕО пухлини; б – після попереднього ЕО

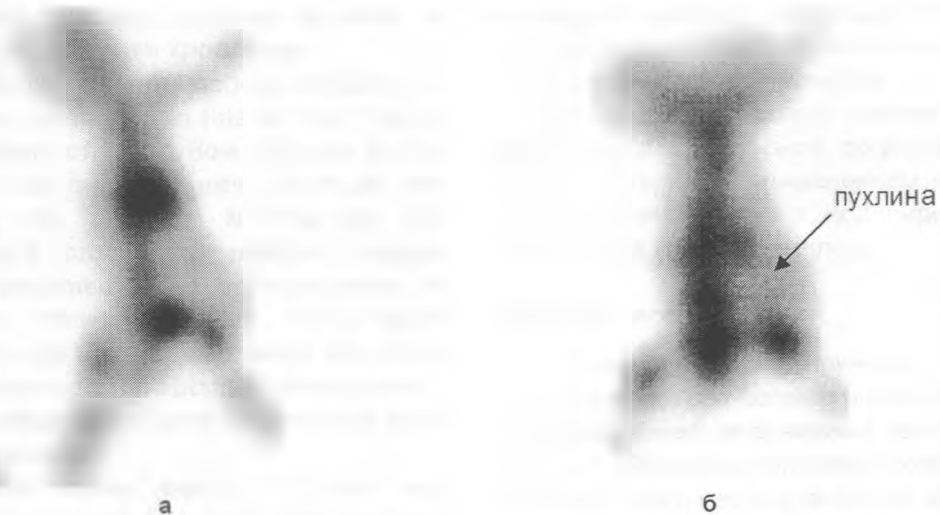


Рис. 3. Сцинтиграфічні зображення тварин за результатами статичної сцинтиграфії через 60 хв після введення препарату: а – офіційного ^{99m}Tc -пірфотех; б – нанокompозиту ^{99m}Tc -пірфотех й Fe_3O_4 з KCl

Висновки

1. Найбільший коефіцієнт гальмування кінетики росту пухлини тварин з карциносаркомою Уокер-256 отримано при проведенні радіочастотної протипухлинної терапії просторово-неоднорідним електромагнітним полем з використанням офіційного доксорубіцину в порівнянні з магніточутливим нанокompозитом Fe_3O_4 з KCl та доксорубіцином.

2. За даними сцинтиграфічних досліджень просторово-неоднорідне електромагнітне поле підвищує кровотік у всьому тілі та пухлині тварини, що дає можливість локально візуалізувати нанокompозит з наночастинок Fe_3O_4 з KCl та радіофармпрепарату ^{99m}Tc -пірфотех у карциносаркомі Уокер-256.

Література

1. Осинский С. П., Ваупель П. Микрофизиология опухолей. – Киев: Наук. думка, 2009. – 254 с.
2. Plotkin M., Gneveckow U., Meier-Hauff K. et al. 18F-FET PET for planning of thermotherapy using magnetic nanoparticles in recurrent glioblastoma // Int J Hyperthermia. – 2006. – V. 22, No. 4. – P. 319-325.
3. Орел В.Э. Хаос и рак, механохимия, механоэмиссия. – Киев: АОЗТ «Телеоптик», 2002. – 296 с.
4. Мовчан Б. А. Электронно-лучевая нанотехнология и новые материалы в медицине – первые шаги // Вісн. фармакол. і фармації. – 2007. – № 12. – С. 5-13.
5. Орел В.Е., Шевченко А.Д. Мельник Ю.Г. та інш. Фізико-хімічні характеристики магніточутливого нанокompлексу, отриманого з ви-

- користанням механомагнетохімічної технології сухого синтезу // *Металлофізика и новейшие технологии*. – 2010. – Т. 32, № 9. – С. 1157-1167.
6. *Эмануэль Н. М.* Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. – Москва: Наука, 1977. – 419 с.
 7. *Orel V., Romanov A.* The effect of spatially inhomogeneous electromagnetic field and local inductive hyperthermia on nonlinear dynamics of the growth for transplanted animal tumors. In: Todd Evans editor. *Nonlinear Dynamics*. Croatia: INTECH. – 2010. – 283-308 p.
 8. *Amstad E., Gillich T., Bilecka I. et al.* Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol-derived anchor groups // *Nano Lett.* – 2009. – V. 9, No. 12. – P. 4042-4048.
 9. *Орел В.Э., Смоланка И.И., Дзятковская И.И.* Радиочастотная терапия в онкологии // *Журнал Академії Медичних Наук України*. – 2009. – Т. 15, № 2. – С. 289-309.
 10. *Кундін В.Ю.* Діагностична значущість сцинтиграфічних досліджень нирок із ^{99m}Tc -фосфатами у дітей // *Український радіологічний журнал*. – 2004. – Т. 12. – С. 255-259.

*Национальный технический университет Украины
«Киевский политехнический институт»*