

УДК 681.2.087.57.089

В.М. Будник, К.П. Короновська, І.І. Дзятковська, М.О. Ніколов, канд. техн. наук, Ю.Г. Мельнік, канд. техн. наук, П.Г. Сутковий, канд. техн. наук, Ю.Д. Мінов, канд. техн. наук, А.В. Романов, канд. техн. наук, М.М. Будник, канд. техн. наук., В.Е. Орел, д-р біол. наук

Виявлення здатності сквід-магнітометрії до візуалізації магніточутливого комплексу на основі наночасток оксиду заліза та доксорубіцину у тілі щурів-пухлиноносіїв

Представлены результаты экспериментальных исследований магнитного комплекса (МК) на основе наночастиц Fe_3O_4 с доксорубицином (ДР). Измерялись животные с карциномой Герена. Продемонстрирована способность неинвазивной СКВИД-магнитометрии выявлять наличие комплексов в теле крысы.

Results of experimental studying the magnetic complex (MC) based on nanoparticles Fe_3O_4 and doxorubicin (DR) is presented. The animal with Geren carcinoma were measured. Enability of non-invasive SQUID-magnetometry to in vivo recognize complexes into the rat body has been demonstrated.

Вступ

Онкологічні захворювання є однією з головних причин смертності працездатного населення в усьому світі. В Україні рівень захворюваності злоякісними новоутвореннями прогресує внаслідок забруднення довкілля радіоактивними та іншими канцерогенними речовинами. Проте проти пухлинні лікарські засоби (ЛЗ), які застосовуються при лікуванні онкологічних хворих мають суттєві недоліки – неспецифічність, токсичність до здорових органів і хіміорезистентність пухлин до них. Тому актуальним є створення системи спрямованої (таргетної) доставки ЛЗ, здатної транспортувати та концентрувати їх в пухлині-мішені потрібний час.

Для цього потрібно відпрацювати технологію та методику моніторингу магнітних носіїв в тілі лабораторних тварин з метою оптимізації режимів їх синтезу, введення та доставки для забезпечення потрібної концентрації іммобілізованого ЛЗ в зоні пухлини. Проте, на сьогодні недостатньо відомостей щодо використання магніточутливих комплексів (МК) на основі наночасток з феромагнетиків для з'ясування їх ролі як векторних систем та засобів протипухлинної терапії [1].

Застосування МК на основі наночасток з оксидом заліза в біомедицині добре відомі і активно досліджуються. За останні роки дослідження проводилися як на тваринах (щури, кролі, свині), так і пацієнтах [2]. На сьогодні існують 4 напрями:

1. *Магнітна біосепарація.*

2. *Магнітна діагностика* для покращення контрасту при магніторезонансній томографії (МРТ) та молекулярна візуалізація при мікроскопічних дослідженнях.

3. *Магнітна доставка ЛЗ.* Переваги нанофармпрепаратів над звичайними полягають у: 1) збільшені тривалості циркуляції у крові, 2) здатності не втрачати ефективності, 3) у можливості концентрації у області-мішені. Ідея магнітної доставки ЛЗ була запропонована більш ніж 30 років тому [3], сенс її застосування полягає у зменшенні [4]:

- побічних ефектів за рахунок зменшення обсягу розповсюдження цитотоксичних ЛЗ в здорових клітинах;
- дози ЛЗ за рахунок їх локальної доставки.

Останнім часом у закордонній літературі широко обговорюються нові типи носіїв та методи неінвазивної ресстрації МК [5].

4. *Радіочастотна гіпертермія* – нагрівання МК у змінному електромагнітному полі [6]. Вона використовується при комплексному лікуванні злоякісних новоутворень [7]. Одна з основних вимог до матеріалу МК – можливість його таргетної доставки в пухлину [8,9]. Ефективність терапії залежить від ряду параметрів [3]: 1) фізичних (амплітуда і градієнт поля, об'ємні та магнітні властивості МК), 2) гідродинамічних параметрів кров'яного русла (швидкість кровотоку, концентрація ферорідини, спосіб введення, час циркуляції); 3) фізіологічних (глибина залягання мішені, зворотність та сила зв'язку ліки-носій, об'єм пухлини). Також актуальним є вплив наноматеріалів на стан здоров'я людини (нанобезпека). Тому сьогодні активно вивчають кореляцію між магнітними та термодинамічними властивостями МК.

Постановка задачі

Для клінічного використання МК важливим є можливість спостерігати за його місцезнаходженням в організмі до початку лікування. Традиційно при проведенні гіпертермії використовують МК з огляду на його біосумісність - нетоксичність, депонування, повільна біодеградація. Візуалізацію зображення та заміри температури проводять за допомогою МРТ [10,11]. Але використання такого високоінформаційного методу як МРТ, який дає анатомічну картину зображення, має і негативні аспекти при візуалізації магнітного наноконкомплексу в організмі-пухлиноносіїв.

Перший недолік – ефект контрастування, який виникає за рахунок зміни в магнітному полі часу релаксації протонів, розташованих поруч з магнітним наноконкомплексом, залежить від їх концентрації і агрегатного стану. Другий недолік полягає в тому, що в сучасних МРТ використовують сильні постійні магнітні поля (до 9,4 Тл), що може спричинити зміни серцевого ритму або до механічного зсуву наночастинок та травмувань внутрішніх тканин з непередбаченими наслідками для пацієнта. Третій недолік – те, що МРТ занадто вартісна для наукових досліджень [12].

Надчутлива СКВІД-магнітометрія - неінвазивний метод, не пов'язаний з шкідливим опроміненням пацієнта, не піддає пацієнта дії значних магнітних полів і взагалі не викликає у пацієнта ніякого дискомфорту. У той же час він дає змогу виявити наявність і локалізувати місце зосередження магнітних носіїв в організмі. Раніше цей метод у поєднанні з використанням високодисперсних МК застосовувався для досліджень імунокомпетентних клітин (альвеолярні макрофаги), феромагнітних забруднень легенів, неінвазивного моніторингу кишково-шлункового тракту (магнітні маркери) [13].

В роботі [14] показано, що СКВІД-магнітометр здатний реєструвати пухлину об'ємом 1 см^3 на відстані 12 см від антени, що відповідає можливій глибині залягання пухлини не тільки в тварини, але й людини. Автори також сформулювали вимоги до «ідеальних» МК для методу СКВІД-магнітометрії: 1) блокуюча температура менше ніж 310 К, 2) макси-мізація магнітного моменту (як функція розміру і складу), 3) нетоксичність, 4) частинки достатньо малі для того, щоб пройти через ретикулоендо-теліальну систему, 5) покриті, щоб уникнути відторгнення.

В результаті виконання проекту НТЦУ №3074 «СКВІД-магнітомет-рична система для контролю магнітних контрастних агентів і направленої транспорту ліків на магнітних носіях» (2006 – 2008, керівник – академік НАНУ Войтович І.Д.) експериментально показано здатність СКВІД-магнітометрії до неінвазивного моніторингу МК в тілі кролів для створення засобів магнітної доставки ЛЗ, вивчення їх впливу на роботу органів-мішеней та мінімізацію побічних ефектів, обумовлених акумуляцією та недостатнім виведенням ЛЗ/МК з організму. Встановлено, що розроблена СКВІД-магнітометрична система здатна реєструвати МК в діапазоні концентрацій 0,1...2 мг носія/мл, при цьому області концентрації відповідають положенню органів кроля, а дія постійним магнітним полем викликає акумуляцію МК в органі-мішені [15-17]. З іншого боку, недавно спеціалістами Інституту експеримента-

льної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Е. Кавецького показано позитивний ефект впливу наночастинок оксиду заліза Fe_3O_4 з NaCl отриманих за допомогою електронно-променевої технології та проти пухлинного препарату доксорубіцину (ДР) на експериментальній моделі пухлинного процесу з асцитною карциномою Ерліха [18].

Мета даної роботи – оцінити можливості методу СКВІД-магнітометрії при візуалізації магнітного комплексу в тілі щурів-пухлиноносіїв.

Матеріали та методи

1. Магніточутливий комплекс. Досліджувався МК на основі магнетиту Fe_3O_4 з KCl та ДР. Наночастинки Fe_3O_4 отримано за допомогою електронно-променевої технології [19]. Синтез наночастинок з ДР (Пфайзер Італія С.р.л., Італія) проводили механохімічним методом. Середній діаметр наночастинок Fe_3O_4 становив 20-40 нм. Детальний опис МК, методу його синтезу та використаного електромагнітного опромінення пухлин наведено у [20].

2. Тварини та трансплантація пухлин. Дослідження проводилось на 10 неінбредних щурах-самках вагою (100 ± 15) г (віварій Національного інституту раку). Трансплантацію пухлинних клітин карциноми Герена здійснювали введенням щурам у праве стегно 30 % суспензії клітин об'ємом 0,4 мл в середовищі 199.

3. Введення магніточутливого комплексу. Введення МК тваринам проводили в масовій концентрації ДР –1,5 мг/кг, Fe_3O_4 – 3 мг/кг. Введення здійснювали в об'ємі 0,3 мл у розчині NaCl у хвостову вену тварини. Введення починали на 8-й день після перещеплення пухлини і проводили 1 раз на 2 доби. Весь курс складався із 5-ти ін'єкцій.

4. Біоетика. Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно норм, встановлених законом України №3447–IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» і Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей від 20.09.85 [21].

5. Методика експерименту. Вимірювання проведені за допомогою СКВІД-магнітометричної системи для дослідження МНЧ у тілі лабораторних кролів (проект УНТЦ 3074) [15,22]. Візуалізація проводилась за допомогою пакету програм «RabbitFix» [23]. Принцип роботи системи полягає у реєстрації відгуку від МК під дією поля намагнічування. Об'єкт переміщують по 36 точках сітки 6x6 з кроком 12 мм, в кожній сигнал реєструють протягом 1 с і записують у файл. Потім сигнал обробляють та виконують реконструкцію розподілу МК у площині та локалізацію їх концентрації у просторі [16,24].

Результати

1. Умови експерименту та результати локалізації. В центрі котушок Гельмгольца створюється поле намагнічування 115 мкТл (струм 0,46 А). Відстань «антена-об'єкт» включає відстань «антена-дно кріостата» (10 мм) та відстань «дно кріостата - верхня точка об'єкта» і становить 12 мм. У таблиці нижче наведено умови та результати обчислення локалізації МК.

Проведенні обчислення координати і глибини об'єкту не відповідають відстані антена-об'єкт, оскільки: не враховано товщину об'єкту; неоптимальний (з огляду на співвідношення діаметру антени і величини кроку) крок між точками при вимірюванні; програма обраховує координати центру ефективного магнітного диполя, який знаходиться в області концентрації МК.

2. Візуалізація результатів вимірювань. Результати обробки подано на рис. 1-3. На всіх рисунках зліва приведені карти магнітного поля (а), над якими наведено значення екстремумів у відліках АЦП (максимум – справа, мінімум – зліва). В центрі (б) подано карти розподілу просторового градієнта магнітного поля у площині, а справа (в) – відображення результатів вирішення оберненої задачі магнітостатики у вигляді квазітривимірної проекції [23].

На картах (б) стрілки вказують напрям ефективного магнітного диполя, а значком «+» позначено область максимальної концентрації МНЧ. Рисунок справа – це візуалізація області максима-

льної концентрації магнітних моментів у кубі розміром 120x120x60 мм, який січеться 12-ма площинами з кроком 5 мм (де 60 мм – це глибина).

3. Візуалізація результатів вимірювань. На Рис. 1 приведено результати вимірювання щура №1 (120x40x20 мм) без МК, на Рис. 2 щура №2, якому ввели 0,3 мл водного розчину МК і провели вимірювання через 1 хв при орієнтації поля ОУ (зверху) та через 5 хв при орієнтації поля ОХ (знизу).

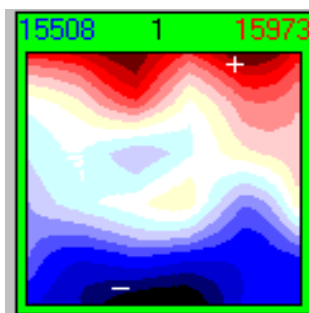
Як видно з Рис. 1в у щура без МК на поверхні тіла, в якомусь органі чи на планшеті знаходяться магнітні забруднення, сигнал від яких зафіксувала система, а після введення МК область концентрації змістилася і роздвоїлася (Рис. 2, зверху). Через 4 хв амплітуда сигналу збільшилася на 8% за рахунок зменшення глибини області концентрації МК, структура області змінилась і знову стала однозв'язною (Рис. 2, знизу).

Також чітко видно, що змінилось положення області концентрації МК – як глибина, так і координати у площині. Ці зміни пов'язані з перерозподілом МК у тілі щура за рахунок їх руху з кровотоком.

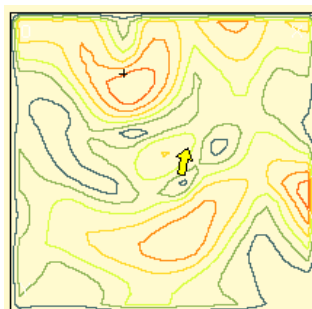
На Рис. 3 наведено результати вимірювань щура №3, якому введено МК за 2 тижні. Видно, що в центрі знаходиться область концентрації МК, відмічена стрілкою. Це означає, що введені МК сконцентрувалися у області розміром близько 1 см, що відповідає розмірам пухлини.

Таблиця 1. Локалізація МК у різні строки введення МК щурам з карциномою Герена

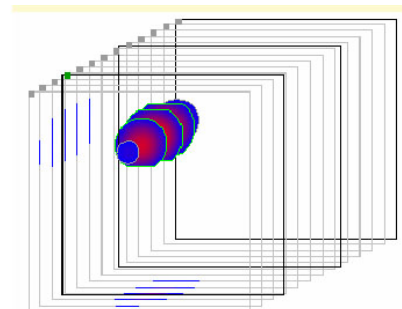
Об'єкт та строки введення МК	Орієнтація поля	Обчислені		Розмах сигналу, відл. АЦП
		глибина, мм	координати, мм	
Щур № 1 без МК	ОУ	41,2	X=33,6, Y=32,3	465
Щур №2, 1 хв після введення	ОУ	33,1	X=19,3, Y=20,1	417
Щур №2, 5 хв після введення	ОХ	25,8	X=57,3, Y=16,8	496
Щур №3, 2 тижні після введення	ОХ	8,7	X=30,5, Y=26,8	399



а



б



в

Рис. 1. Щур №1 без МК: а – карта поля, б – розподіл МК у площині, в – локалізація області МК у просторі

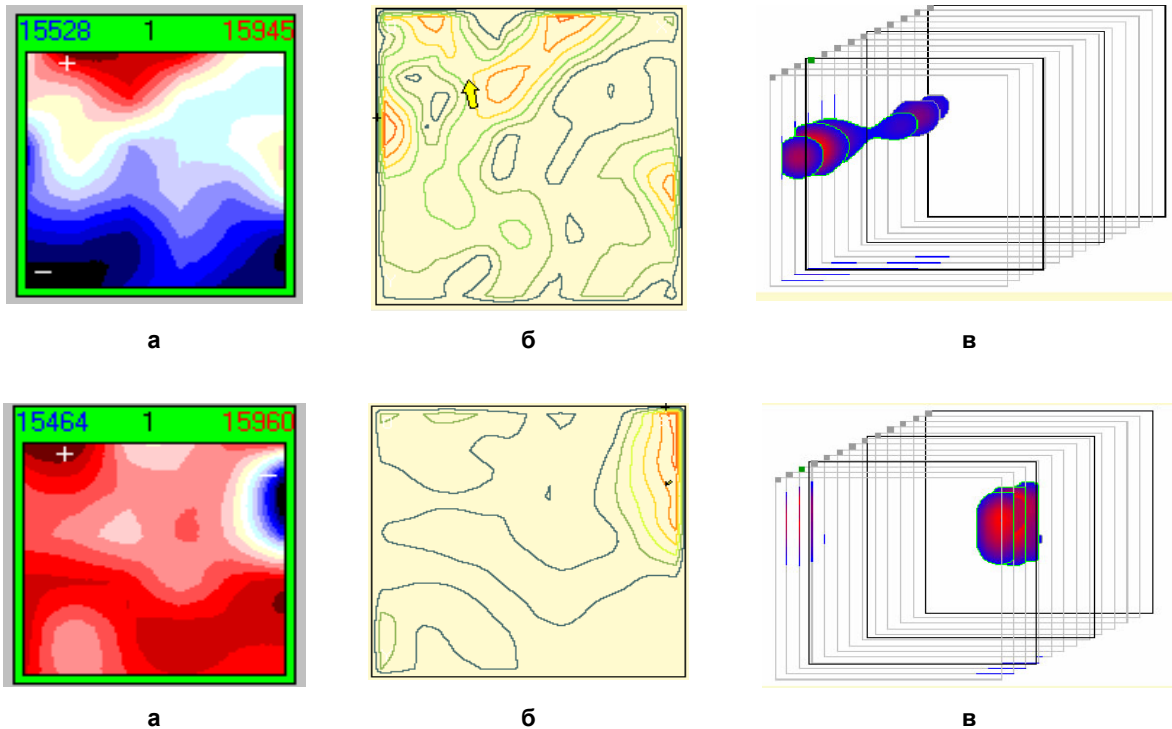


Рис.2. Щур №2 через 1 хв (зверху) та 5 хв (знизу) після введення МК

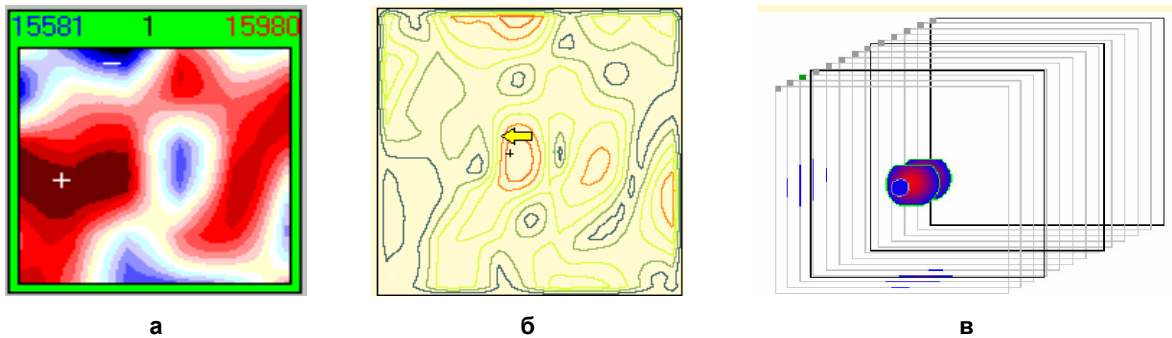


Рис. 3. Щур №3 з карциною Герена через 2 тижні після введення МК

Висновки

Результати вимірювань показали наступне:

1) Положення максимуму області МК на рисунках у площині відповідає розташуванню у просторі тестових зразків.

2) Обчислені глибини тестових зразків не відповідають реальним через використання неоптимального (з огляду на співвідношення діаметру антени і величини кроку) кроку вимірювальної сітки.

3) При дослідженні щура локалізовано області концентрації МК та зміну її структури (роздвоєння) і глибини через 1 хв після введення.

4) Через 4 хв після введення МК амплітуда сигналу збільшилась за рахунок зменшення глибини області концентрації МК, структура області змінилась і знову стала однозв'язною. Також чітко видно, що змінилось положення області, як глибина, так і координати у площині. Ці зміни пов'язані з перерозподілом МК у тілі щура за рахунок їх руху.

5) У щура, якому ввели МК за 2 тижні до вимірювань, виявлено область концентрації МК діаметром біля 1 см, що приблизно відповідає розмірам та розташуванню пухлини у правому стегні тварини.

6) При вимірюванні щурів реєстрували слабкий сигнал, оскільки концентрація (0,003 мг/мл) та об'єм (0,3 мл) введених МК замалі. Згідно результатів вимірювання кролів [22] достовірний сигнал зафіксовано від МК розміром 50 нм, водна суспензія об'ємом 2 мл. Згідно калібрування [24] діапазон концентрацій МК 0,5÷2 мг/мл. Отже, мінімальна концентрація МК 0,5 мг/мл, а щурам водили 0,003 мг/мл, що у 167 разів менше.

Загальний висновок: Результати дослідження щурів з введеними МК підтвердили здатність СКВІД магнітометричної системи до локалізації області концентрації МНЧ та спостереження за їх зміною у часі.

Автори висловлюють подяку співробітникам Інституту кібернетики НАН України Проміну М.А., Недайводи І.В. та Васильєву В.Є., які розробили програму «RabbitFix» по проекту УНТЦ №3074.

Література

1. *Налескіна Л.А., Бородай Н.В., Чехун В.Ф.* Сьогодення та перспективи створення наносистем спрямованої доставки лікарських препаратів до пухлинних клітин// *Онкологія - т.11, №3.- 2009. - с.166-173*
2. *Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications / Laurent S., Forge D., Port M. et al. // Chem. Rev. – 2008. – Vol. 108. – P. 2064-2110.*
3. *Widder KJ, Senyei AE and Scarpelli DG, Magnetic microspheres: a model system for site specific drug delivery in vivo, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 58, 1978, 141-146.*
4. *Pankhurst Q., Connolly J., Jones S., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. J.Phys.D:Appl.Phys.- 2003.- 36:R167-R181.*
5. *Nikitin MP et al; Cardoso FA et al; J. Appl. Phys. 103, 2008*
6. *Орел В.Э., Смоленка И.И., Дзятковская И.И.* Радиочастотная терапия в онкологии // *Журнал АМН України.- 2009.- Т.15,№2.- С. 289-309.*
7. *Комплексна терапія хворих на саркому м'яких тканин кінцівок та тулубу з використанням радіочастотної гіпертермії/ В.Е. Орел, А.Ю. Палівець, С.І. Коровін та ін.//Променева діагностика, променева терапія: матер. Укр. конгресу радіологів України.- Київ, 2009.-С. 185.*
8. *Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy / X. Peng, X. Qian, H. Mao // Int J Nanomedicine. 2008, 3(3): 311–321.*
9. *Chen F.H., Gao Q., Ni J.Z.* The grafting and release behavior of doxorubicin from Fe₃O₄@SiO₂ core-shell structure nanoparticles via an acid cleaving amide bond: the potential for magnetic targeting drug delivery // *Nanotechnology, 19, 2008, p. 165103.1-165103.9.*
10. *Intracranial Thermoablation using Magnetic Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy: Results of a Feasibility Study on Patients with Glioblastoma Multiforme / Maier-Hauff K., Rothe R., Scholz R. Et al. // J. of Neuro-Oncology, .Vol. 81, Number 1, p. 53-60;*
11. *MR-imaging changes of musculoskeletal soft-tissue sarcomas associated with neoadjuvant chemotherapy and hyperthermia / A. Baur, A. Stähler, C. Wendtner et al. // Int. J. of Hyperthermia, 2003, Vol. 19, No. 4, p. 391-40.*
12. *Магнітний резонанс в медицині. Под. ред. П.А.Ринка. Bruckwell Scientific Publications:Oxford. – 1994. – 228 с.*
13. *Some biomedical applications of ferrofluids / J. Roger, J. Pons et al. // Eur. Phys. J. AP. – 1999. – v. 5. – P. 321-325.*
14. *Detection of magnetically enhanced cancer tumors using SQUID-magnetometry: a feasibility study / G. Kennig, R Rodrigues, V Zotev et al // Rev. Sci. Instrum.– 2005. - Vol.76, Issue 1. - doi:10.1063/1.1834696.*
15. *Розробка СКВІД-магнітометричної системи для дослідження магнітних наночастинок у тілі лабораторних тварин /Т. Риженко, М.Будник, І. Войтович та ін. // Електроніка і зв'язок. – 2008. – №3-4. – с. 164-168.*
16. *Риженко Т., Будник М., Короновська К.* Дослідження магнітних наноматеріалів на експериментальних моделях in vivo та in vitro // *Електроніка і зв'язок. - №4-5. – 2009. – с.63-67.*
17. *SQUID-imaging technology to study magnetic nanocarriers for targeted magnetic transport of drugs / M.Budnyk, N.Dudchenko, I.Voytovych et al.//Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 2009, V.40, No.4, p. 302-307.*
18. *The influence of ferromagnetic nanoparticles on antitumor effects of doxorubicin in Ehrlich ascitic carcinoma-bearing mice / V.Chekhun, G.Kulik, I.Todor et al. // Book of Abstr. of German-Ukr. Symp. on Nanoscience and Nanotechnology (GUS'2008). – Essen, 2008: p.72.*
19. *Мовчан Б.* Електронно-лучевая нанотехнология и новые материалы в медицине - первые шаги / *Вісн. фармак. і фармації, 2007, №12, с.5-13.*
20. *Орел В. та ін.* Вивчення впливу магніточутливого комплексу на основі наночастинок оксида заліза, доксорубіцину та неоднорідного електромагнітного опромінення на нелінійну динаміку росту пухлин і виживаність тварин-пухлиноносіїв з карциномою Герена// *див. у цьому випуску.*
21. *Резников О.* Проблеми етики при проведенні експ-них медичних і біол. досліджень на тваринах//*Вісн. НАН України.-2001.-№ 1.-С.5-7.*
22. *SQUID imaging system for studying magnetic nanoparticles / M.Budnyk, I.Voytovych, Yu.Minov et al. // In: Biomagnetism: Interdisciplinary Research and Exploration. – Sapporo: Hokkaido Univ. Press. Eds. R. Kakigi, K. Yokosawa, S.Kuriki. – p. 30-32.*
23. *Primin Mikhaylo, Nedayvoda Igor.* Algorithms for the magnetostatic inverse problem solution: new approaches and some results // *Int. J. on Applied Electromagnetics in Mechanics.– Vol.29, No. 2. – 2009. – p. 65-81.*
24. *Осталчук О., Будник М., Чайковський І., Михайлик О.* Дослідження каліброваних зразків МНЧ методом СКВІД-магнітометрії // *Зб. доп. н.-техн. Семінару «Біомед. інформаційні технології в охороні здоров'я» (БМІТ-2008) / під ред. М.Будника. – Київ: Ін-т кібернетики НАНУ.–18-21 червня 2008, Київ-Жукін (Україна).–с.2-31-2-38.*