

УДК 616-006.07

В.Е. Орел, д-р біол. наук, П.П. Лошицький, д-р техн. наук, Ю.А. Куратов, канд. техн. наук, М.О. Ніколов, канд. техн. наук, І.І. Дзятковська, А.В. Романов, канд. техн. наук, Ю.Г. Мельник, канд. техн. наук, Н.М. Дзятковська, канд. біол. наук

Вивчення впливу магніточутливого комплексу та неоднорідного електромагнітного поля на нелінійну динаміку росту пухлин і виживаність тварин з карциномою Герена

Внутривенное введение механохимически синтезированного магниточувствительного комплекса из наночастиц Fe_3O_4 с KCl и противоопухолевого препарата доxorубина, а также последующее внешнее локальное облучение неоднородным электромагнитным полем карциномы Герена увеличивало на 56% выживаемость животных по сравнению с экспериментами, когда использовали только официальный доxorубин.

Intravenous introduction of mechanochemically synthesized magnetosensitive complex on the basis of nanoparticles of Fe_3O_4 , KCl and anti-tumor drug - doxorubicin and next irradiation by local spatially inhomogeneous electromagnetic field and mild hyperthermia of Guerin carcinoma increased on 56% survival of animals as compared to experiments when treatment by conventional doxorubicin only.

Вступ

В останнє десятиріччя були розроблені та запропоновані методи лікування онкологічних хворих з використанням високотемпературної гіпертермії (ГТ) за температур 43 – 70 °С, ініційованих електромагнітним радіочастотним опроміненням, та магнітних наночастинок оксиду заліза з аminosилановим покриттям. Аналіз клінічних результатів термотерапії з використанням магнітних наночастинок може бути зведений до порівняння наступних позитивних та негативних ефектів. Позитивні ефекти: переважно селективна дія на пухлинні тканини, без істотного впливу на нормальні тканини; малоінвазивний метод введення наночастинок сприяє комфортному ефекту терапії; процедури можуть повторюватися впродовж від декількох тижнів до місяців; лікування можна планувати в трьохвимірному просторі з достатньо високою точністю розподілення тепла в тканинах, що опромінюються. Негативні ефекти: неможливість однорідного розподілу часток всередині пухлини; обмеження в параметрах магнітного поля (< 4 кА/м, 100 кГц) для терапії пухлин черевної порожнини; високі теплові градієнти під час радіочастотної ГТ в злоякісних пухлинах при температурах вище 41°С можуть супроводжуватись формуванням термо-

толерантності (терморезистентності) на клітинному рівні, внаслідок ініціювання синтезу білків теплового шоку та може порушуватись внутрішньопухлинний кровотік; локально-регіональну терапію з використанням магнітних наночастинок неможливо проводити для дисемінованих пухлин. Взагалі пілотні клінічні дослідження з використанням магнітокерованих наночастинок за температури вище 41 °С свідчать про несуттєвий прогрес в результатах комплексного лікування онкологічних хворих [1].

Відомо, що гіпоксія є одною з найбільш характерних ознак злоякісної пухлини та обумовлена значними структурними та функціональними аномаліями гетерогенної внутрішньопухлинної мікроциркуляції, а локальна помірнa ГТ краще ніж високотемпературна підвищує кровоток в пухлинні, що ініціює її оксигенацію та судинну проникність для протипухлинних ліків [2]. Виходячи з цього були розроблені методи лікування з застосуванням локального опромінення неоднорідним електромагнітним полем (ЕМП) при помірній ГТ злоякісних пухлин [3], а також окремо були використанні механохімічно ініційовані заряджені наночастилки протипухлинного препарату доxorубіцину (ДР) при комплексному лікуванні онкологічних хворих [4]. Проведені пілотні клінічні дослідження засвідчили можливість кращого подолання вищезазначених проблем при комбінованому лікуванні онкологічних хворих з застосуванням електромагнітного опромінення (ЕО) та помірної ГТ, але залишилася невирішеною проблема можливості сумісного використання магнітних наночастинок та неоднорідного радіочастотного ЕМП при помірній ГТ злоякісних пухлин.

Виходячи з цього, метою даної роботи було експериментальне дослідження впливу механохімічно синтезованого магніточутливого комплексу на основі Fe_3O_4 з KCl й ДР та зовнішнього локального ЕО неоднорідним радіочастотним ЕМП на нелінійну динаміку росту пухлин та виживаність тварин з карциномою Герена.

Матеріали та методи

Магніточутливий комплекс. В роботі досліджували магніточутливий комплекс на основі

наночасток оксиду заліза Fe_3O_4 з KCl та ДР. Середній діаметр наночасток магнетиту, отриманих з застосуванням технології електронно-променевого випаровування та конденсації в вакуумі неорганічних матеріалів, складав 20 – 40 нм [5]. Використовували ДР виробництва Пфайзер Італія С.р.л. (Італія). Надалі наноконкомплекс Fe_3O_4 з KCl будемо називати «наносистемою», а комплекс на основі Fe_3O_4 з KCl й ДР – «магніточутливим комплексом» (МК).

Для використання наносистеми Fe_3O_4 з KCl в експерименті його попередньо очищували від надлишку KCl. Методика очищення була наступною: 500 мг Fe_3O_4 з KCl розчиняли в 5 мл дистильованої води та інкубували на водяній бані протягом 15 хв за температури 60 °С при постійному помішуванні. Потім проводили центрифугування при 3000 об/хв протягом 15 хв, отриману надосадову рідину зливали. Осад знову розчиняли в 5 мл дистильованої води, інкубували на водяній бані та центрифугували. Дану процедуру повторювали 3 рази. Отриманий очищений МК висушували в термостаті за температури 60 °С.

Електронна мікроскопія. Для дослідження мікроструктури використовували растровий електронний мікроскоп РЕМ-106И («SELMI» ОАО). Дослідження проводилися за стандартною методикою при збільшенні 400-10000 разів в режимі низького вакууму (тиск в робочому об'ємі складав 40 Па). Гетерогенність (G) мікроструктур оцінювали згідно [7].

Визначення хімічного складу (C, K, Cl та Fe) проведено методом енергодисперсійного спектрального аналізу.

Вплив електромагнітного опромінення на динаміку нагріву наносистеми. Виходячи з того, що до складу наносистеми входив крім Fe_3O_4 також KCl, з метою диференціації основного акцептора ЕМП, провели дослідження по вивченню кінетики нагріву розчиненої у дистильованій воді наносистеми під впливом ЕО. 1 г наносистеми Fe_3O_4 з KCl розчиняли у 10 мл дистильованої води та опромінювали в спіральному індуктивному аплікаторі частотою 40 МГц з вихідною потужністю 40 Вт. Для мінімізації втрат тепла флакон з рідиною, що досліджувалась, знаходився в поролоновій термоізоляції. Результати динаміки нагріву розчину наносистеми Fe_3O_4 з KCl під впливом ЕО порівнювали з відповідною динамікою 10 % розчину KCl, дистильованою водою, надосадовою рідиною розчину наноконкомплексу Fe_3O_4 з KCl. Температуру розчинів вимірювали безпосередньо під час ЕО оптоелектронним термометром («Радмір», Україна).

Для кількісної оцінки кінетики нагріву магніточутливої наносистеми під впливом ЕО, виходячи з якісної оцінки отриманих даних, використовували лінійну апроксимацію експериментальних даних:

$$T(t) = at + b,$$

де T – температура (°С); t – час (хв); a та b – коефіцієнти рівняння, що характеризують швидкість наростання температури в системі та початкову температуру відповідно.

Тварини та трансплантація пухлин. Дослідження було проведено на 40 неінbredних щурах-самках вагою (100 ± 15) г розводки віварію Національного інституту раку з перещепленою карциномою Герена. Трансплантацію пухлинних клітин карциноми Герена здійснювали введенням щурам в праве стегно 30 % суспензії клітин в об'ємі 0,4 мл в середовищі 199.

Тварини були розподілені на 4 групи, кожна з яких складалася з 10 тварин: 1 група – контроль (без введення ДР, МК і ЕО); 2 група – введення ДР; 3 група – введення МК; 4 група – введення МК+ЕО. Строк спостереження за тваринами складав 60 днів.

Для оцінки ефекту впливу на нелінійну динаміку росту пухлин тварин використовували фактор росту ϕ та коефіцієнт гальмування росту пухлини тварин k згідно [8].

Механохімічний синтез магніточутливого комплексу та електромагнітне опромінення тварин. За 20-40 хв перед проведенням комбінованого впливу на злоякісні пухлини тварин наночастки Fe_3O_4 з KCl та ДР синтезували в МК за допомогою мікрівібромліну «MMVE-005» (Гефест, Росія) з інтенсивністю підвода механічної енергії 20 Вт/г протягом 5 хв. Введення ДР тваринам проводили в концентрації 1,5 мг/кг; МК: ДР – 1,5 мг/кг, Fe_3O_4 – 3 мг/кг. Введення ДР та МК здійснювали в об'ємі 0,3 мл у розчині NaCl у хвостову вену тварини. Введення препаратів та ЕО починали на 8 день після перещеплення пухлини і проводили 1 раз в 2 доби. Весь курс складався з 3 ін'єкцій і/або 3 сеансів ЕО.

В зоні пухлини розташовували постійний магніт з магнітною напруженістю 1990 А/м для локалізації МК в пухлинних клітинах. Наступне локальне неоднорідне ЕО пухлин проводили протягом 15 хв за допомогою прототипу апарата «Магнітерм» на частоті 40 МГц та при вихідній потужності 100 Вт. При цьому внутрішньопухлинна температура не перевищувала 37,9 °С, що характерно для помірної ГТ.

Біоетика. 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 [6].

Результати.

Електронна мікроскопія. Із аналізу даних в табл. 1 випливає, що очищення Fe_3O_4 з KCl підвищує з 21,11 до 70,06 % у його складі Fe та зменшує K і Cl з 44,86 та 32,36 до 8,97 та 6,64 % відповідно. Наступний механохімічний синтез МК ще більше знизив кількість K та Cl до 0,27 та 0,22 % відповідно та підвищив ваговий склад заліза в МК до 80,36 %. Слід відмітити наявність кисню після очистки та механохімічного синтезу в МК.

Таблиця 1. Ваговий склад наносистеми до та після очистки та механохімічного синтезу МК

Елемент	Концентрація, %, похибка ~5 %		
	Неочищений Fe_3O_4 + KCl	Очищений Fe_3O_4 + KCl	Очищений та механохімічно синтезований Fe_3O_4 + KCl+ДР
C	1,68	2,03	14,44
Cl	32,36	6,64	0,22
K	44,86	8,97	0,27
Fe	21,11	70,06	80,36
O	-	7,90	3,38

На рис. 1 наведені типові зміни мікроструктури ДР та МК під впливом очистки та механохімічного синтезу. Аналіз гетерогенності мікроструктури

свідчить, що після механохімічного синтезу гетерогенність структури МК стала менше в 1,9 рази ніж у Fe_3O_4 з KCl без механохімічного синтезу.

Кінетика нагріву наносистеми під впливом електромагнітного опромінення. Результати кінетики нагріву розчинів наносистем Fe_3O_4 з KCl, 10% розчину KCl та дистильованої води наведені на рис. 2. Результати кількісної оцінки кінетики нагріву компонентів МК наведені в табл. 2. Квадрат коефіцієнта кореляції експери-

ментальних даних та їх лінійної апроксимації складав $0,98 \pm 0,01$.

Аналізуючи отримані данні слід відмітити, що найбільший нагрів до $+60$ °C протягом 7 хв опромінення спостерігався в 10 % розчині KCl, де швидкість нагріву розчину під час ЕО складала $6,73$ °C/хв. Зразки Fe_3O_4 з KCl нагрівалися за той самий час на дещо меншу температуру – до $+50$ °C, швидкість нагріву розчину складала $3,97$ °C/хв.

Таблиця 2. Коефіцієнти лінійної апроксимації кінетики нагріву розчинів під впливом ЕО

Розчин	Коефіцієнти лінійної апроксимації	
	a, °C/хв	b, °C
10% розчин KCl	6,73	20,18
Розчин наносистеми Fe_3O_4 з KCl	3,97	22,69
Надосадова рідина розчину наносистеми Fe_3O_4 з KCl	3,80	23,40
Дистильована вода	0,43	18,94

При цьому надосадова рідина, яка утворювалася в розчиненому у дистильованій воді Fe_3O_4 з KCl мала подібну кінетику нагріву, швидкість нагріву розчину складала $3,80$ °C/хв. Температура дистильованої води майже не змінювалась порівняно з іншими зразками, що досліджувались. Тобто основним акцептором ЕМП був KCl.

Зміни нелінійної динаміки пухлинного росту. Аналіз нелінійної динаміки росту карциноми Герена (рис. 3, табл. 3) свідчить, що у тварин 2-ої групи після введення ДР та 3-ої груп після введення МК параметри ϕ були відповідно менше на 16 та 9 %, а параметри κ відповідно більше на 20 % та 12 % ніж в 1-ій контрольній групі. Але найменший об'єм карциноми Герена на 19 добу після перещеплення був у тварин 4-ої групи, яким вводили внутрішньовенно МК та проводили зовнішнє локальне ЕО. Параметр ϕ у

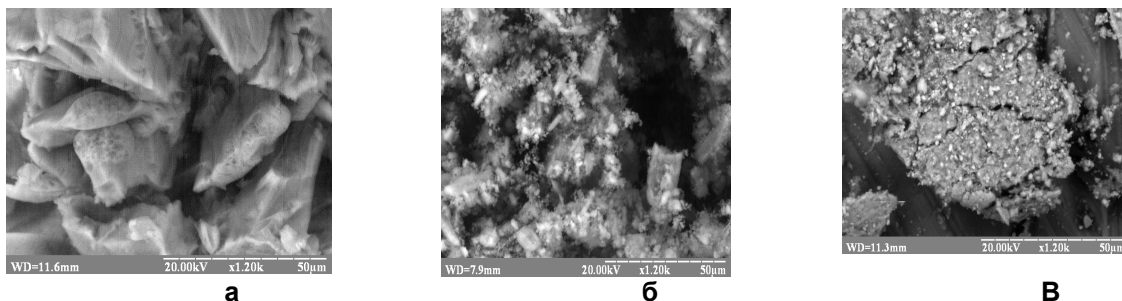


Рис. 1. Мікроструктура та гетерогенність (G) механохімічно синтезованого МК та його компонентів: а – ДР (G=0,22); б – Fe_3O_4 та KCl (G=0,74); в – механохімічно синтезований МК (G=0,39)

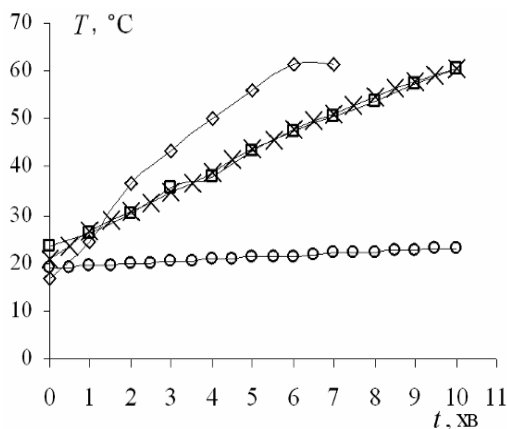


Рис. 2. Кінетики нагріву розчинів під впливом ЕО: о – дистильована вода; а - 10% розчин КСІ; □ – розчин наносистеми Fe₃O₄ з КСІ; х – надосадова рідина наносистеми Fe₃O₄ з КСІ.

4-ій групі мав тенденцію до зменшення по відношенню до аналогічного параметру у тварин-пухлиноносіїв 2-ої групи. Виживаність тварин також була найвища у тварин 4-ої групи (рис. 4). Вона перевищувала виживаність тварин з 1-ої групи у 9 разів, а тварин з 2-ої та 3-ої груп в середньому на 55 %.

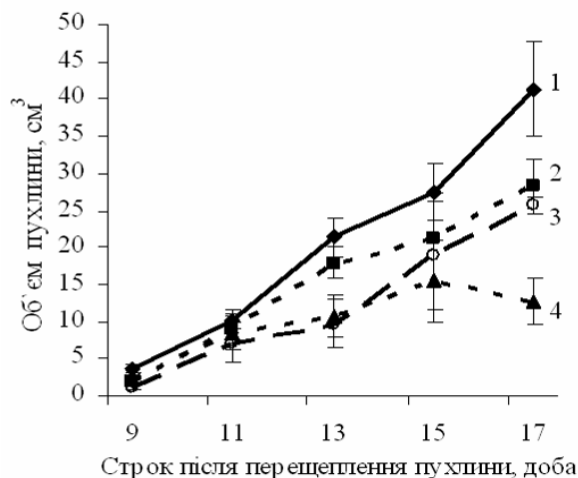


Рис. 3. Вплив МК та ЕО на ріст карциноми Герена: 1 – контроль (без введення ДР, МК і ЕО); 2 – введення ДР; 3 – введення МК; 4 – введення МК +ЕО

Таблиця. 3. Параметри нелінійної динаміки росту карциноми Герена протягом з 7 по 24 добу після перещеплення

№, група тварин	Параметри	
	φ, доба-1	κ
1. Контроль (без введення ДР, МК і ЕО)	0,44±0,03	1
2. Введення ДР	0,37±0,01*	1,20
3. Введення МК	0,40±0,01	1,12
4. Введення МК + ЕО	0,35±0,01*	1,25

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

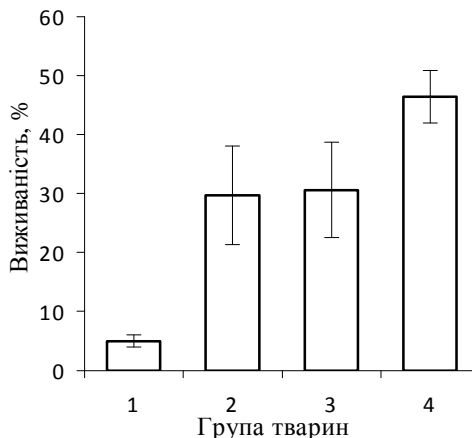


Рис. 4. Виживаність тварин з карциною Герена: 1 – контроль (без введення ДР і ЕО); 2 – введення ДР; 3 – введення МК; 4 – введення МК+ЕО.

Отримані експериментальні результати підвищення протипухлинної активності та подовження виживаності тварин з карциною Герена після введення механохімічно синтезованого МК на основі Fe₃O₄ з КСІ і ДР при зовнішньому опроміненні неоднорідним ЕМП та помірній ГТ вірогідно пов'язані не лише з підвищенням локального протипухлинного ефекту, а і з можливим загальним впливом на коригувальні процеси в організмі тварин-пухлиноносіїв при комбінованому впливі застосованих факторів. Перший локальний протипухлинний ефект, ініційований зовнішнім опроміненням неоднорідним ЕМП, вірогідно, обумовлено спіновою конверсією та ініціацією вільнорадикальних реакцій за участю активних форм кисню та азоту при хіміотерапії [9]. Другий загальний протипухлинний ефект на основі сценарію Помо-Манневілья [10, 11], тобто переходу від характерного для злоякісного процесу хаосу в організмі тварини-пухлиноносія до порядку, внаслідок поглинання неоднорідного електромагнітного поля та ініціації неоднорідного теплового поля. Це, можливо, зменшувало типову для злоякісного процесу гіпоксію в пухлинах та її структурно-функціональні аномалії гетерогенної внутрішньо пухлинної мікроциркуляції [12]. Подальше поглиблене вивчення протипухлинної ефективності МК з одночасним локальним ЕО може в перспективі сприяти удосконаленню лікувальних програм для онкологічних хворих.

Висновки

1. Після очищення та механохімічного синтезу в магніточутливому комплексі суттєво підвищує ваговий склад заліза, а також зменшується гетерогенність отриманої структури.

2. При електромагнітному опроміненні розчинів на частоті 40 МГц підвищення температури відбувається за рахунок розчиненого KCl, наноконкомплекс Fe_3O_4 з KCl суттєво не впливає на зміну температури.

3. При використанні механохімічно синтезованого магніточутливого комплексу з наночасток Fe_3O_4 з KCl та доксорубіцину при зовнішньому опроміненні неоднорідним електромагнітним полем та помірній гіпертермії карциноми Герена коефіцієнт гальмування росту пухлини перевищував на 4 % аналогічний параметр та на 56 % збільшувалась виживаність у тварин-пухлиноносіїв порівняно з експериментом, коли використовували лише офіційний доксорубіцин.

Література

1. *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 // *Journal of Neuro-Oncology*. – 2006. – Vol. 81, No. 1. – P. 53-60.
2. *Song C., Park H., Lee C., Griffin R.* Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment // *Int. J. Hyperthermia*. – 2005. – Vol. 21. – P. 761–767.
3. *Смолянко І.І., Черниш В.О., Орел В.Е. та інш.* Використання апарату «Магнітерм» в комплексній терапії хворих на рак молочної залози // *Здоровье женщины*. – 2008. – Т. 36, № 3, ч. 2. – С. 134–136.
4. *Орел В.Э., Сивкович С.А., Дзятковская Н.Н.* Применение механохимически активированных заряженных наночастиц доксорубицина при полихимиотерапии больных злокачественными лимфомами // *Онкология*. – 2007. – Т. 9, № 3. – С. 234–237.
5. *Мовчан Б.А.* Электронно-лучевая нанотехнология и новые материалы в медицине – первые шаги // *Вісн. фармакол. і фармації*. – 2007. – №12. – С. 5–13.
6. *Orel V., Kozarenko T., Galachin K. et al.* Non-linear Analysis of Digital Images and Doppler Measurements for Trophoblastic Tumor // *Non Dyn, Psych, and Life Sci*. – 2007. – No. 11. – P. 309–331.
7. *Эмануэль Н.М.* Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. – М.: Наука, 1977. – 419 с.
8. *Резников О.Г.* Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // *Вісн. НАН України*. – 2001. – № 1. – С. 5–7.
9. *Бучаченко А.Л., Сагдеев Р.З., Салихов К.М.* Магнитные и спиновые эффекты в химических реакциях. – Новосибирск: Наука, 1978. – 286 с.
10. *Орел В.Э.* Хаос и рак, механохимия, Меланомиссия. – К.: АОЗТ «Телеоптик», 2002. – 296 с.
11. *Карлов Н.В., Кириченко Н.А.* Колебания, волны, структуры. – М.: Физматлит, 2001. – 496 с.
12. *Осинский С.П., Ваупель П.* Микрофизиология опухолей. – К.: Наукова думка, 2009. – 254 с.