



УДК 616-006.07

**В. Е. Орел, А. Д. Шевченко, О. Ю. Рихальський,
А. В. Романов, А. П. Бурлака, С. М. Лукін,
член-кореспондент НАН України Є. Ф. Венгер, Є. П. Сидорик,
І. Б. Щепотін**

Магнітна нанотерапія тварин із карциносаркомою Уокер-256

У досліджах на тваринах виявлено залежність протипухлинного ефекту магнітної нанотерапії від магнітних параметрів магніточутливого наноконструксу (МНК), до складу якого входили наночастинки Fe_3O_4 та протипухлинний препарат доксорубіцин, при сумісному локальному опроміненні постійним магнітним й електромагнітним полями карциносаркоми Уокер-256. Протипухлинний ефект та виживаність тварин були найвищими при використанні МНК з більшими магнітним моментом насичення, площею петлі магнітного гістерезису та меншою коерцитивною силою. Температура всередині пухлини не перевищувала $38^\circ C$. Отримані результати можуть бути використані для лікування онкологічних хворих.

Проведені за останнє десятиріччя експериментальні та клінічні дослідження продемонстрували певні перспективи використання технологій магнітної нанотерапії в лікуванні злоякісних новоутворень. До них можна віднести: 1) вищу ймовірність селективного накопичення магніточутливих наноконструксів (МНК) в пухлинах; 2) терапія проводиться без анестезії; 3) підсилення протипухлинного ефекту за рахунок індукційної гіпертермії хімотерапевтичного ефекту препаратів або безпосередньої абляції (вапоризації) пухлин. Разом з цим було виявлено і ряд проблемних питань: 1) незначна поверхнева селективність МНК між злоякісними і нормальними клітинами; 2) індукційна гіпертермія в злоякісних пухлинах при температурі вище $41^\circ C$ може супроводжуватися формуванням термотолерантності (терморезистентності) на клітинному рівні внаслідок ініціації синтезу білків теплового шоку; 3) ймовірне виникнення негативних побічних ефектів у пацієнтів при температурі вище $41^\circ C$ внаслідок підвищення на 2–12 дихальних циклів/хв, артеріального тиску на 20–40 мм рт. ст. та частоти пульсу на 20–60 уд/хв; 4) істотне зниження тканинної перфузії в злоякісних пухлинах при температурі вище $45^\circ C$ [1].

© В. Е. Орел, А. Д. Шевченко, О. Ю. Рихальський, А. В. Романов, А. П. Бурлака, С. М. Лукін, Є. Ф. Венгер, Є. П. Сидорик, І. Б. Щепотін, 2014

Альтернативним підходом для вирішення наведених вище проблемних питань може бути розробка протипухлинної технології магнітної нанотерапії в умовах помірної радіочастотної гіпертермії (РГТ) в пухлині (до 38 °С) [2]. Механізм дії технології заснований на впливі слабких постійних і змінних магнітних полів на кінетику магнетохімічних вільнорадикальних реакцій [3]. В основі цих ефектів лежить принцип спінової селекції — реакції можливі лише з визначених спінових станів. Внаслідок взаємодії двох радикалів утворюється радикальна пара в синглетному або в триплетному стані, але рекомбінація цих радикалів у молекулу відбувається лише із синглетної пари. Реакція в триплетній парі заборонена згідно з принципом Паулі. Це може бути актуальним при використанні технології магнітної нанотерапії для підвищення протипухлинного ефекту МНК на основі наночастинок Fe_3O_4 та антрациклінового антибіотика доксорубіцину (ДР), протипухлинну дію якого пов'язують з вільнорадикальними реакціями, що призводять до формування активних форм кисню через реакцію Фентона та пероксидного окиснення ліпідів клітинних мембран [4].

Ми ставили за мету здійснити порівняльне дослідження протипухлинного впливу магнітного наноконструксу з різними магнітними характеристиками на тварин з карциносаркомою Уокер-256.

Магнітні характеристики препарату досліджували методом магнітометрії на вібраційному магнітометрі “Vibrating Magnetometer 7404 VSM” (“Lake Shore Cryotronics, Inc. ”, США) в магнітних полях з напруженістю до 13000 Е. 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 парамагнітних центрів (стабільних вільних радикалів) вивчали спектри електронного парамагнітного резонансу (ЕПР), які реєстрували на модернізованому спектрометрі марки РЕ1307 (ЗЕПС АН) в циліндричному резонаторі з модою Н011 на частоті $(9,15 \pm 0,01)$ ГГц. Потужність надвисокочастотного випромінювання становила 40 мВт. Використовували модуляцію магнітного поля частотою 100 кГц. Пробу розміщували у кварцовому дьюарі. Об'єм проби становив 30 мкл.

Як самостійні частини або складові препаратів МНК були використані наночастинки оксиду заліза Fe_3O_4 діаметром < 50 нм (“Sigma”, “Aldrich”) й ДР (“Пфайзер”, Італія). Механомагнітохімічний синтез МНК проводили за допомогою механомагнітного реактора “ММР1” (НІР, Україна). МНК піддавали постійній механічній активації з інтенсивністю підводу механічної енергії 20 Вт/г та частотою 35 Гц за допомогою просторового коливання камери з кульками та одночасній дії радіочастотного випромінювання від індуктора з частотою 40 МГц з вихідною потужністю 2 Вт і при змінних параметрах постійного магнітного поля (ПМП) неодимових магнітів протягом 5 хв [2]. Були синтезовані два типи зразків МНК з відмінними магнітними характеристиками — МНК 1 при дії ПМП 5 мТл та МНК 2 при 8 мТл. Також досліджували вплив ПМП 5 і 8 мТл механомагнітної активації на зразки оксиду заліза, позначені відповідно дії ПМП Fe_3O_4 1, Fe_3O_4 2, та на зразки ДР, позначені ДР 1 і ДР 2.

Дослідження протипухлинної активності ДР, МНК, ПМП та електромагнітного опромінення (ЕО) було проведено на 60 неінbredних щурах-самках масою (175 ± 14) г розводки віварію Національного інституту раку. Трансплантацію пухлинних клітин карциносаркоми Уокер-256 здійснювали введенням щурам у праве стегно 20% суспензії клітин в об'ємі 0,4 мл в середовищі 199. Введення ДР тваринам проводили в дозі 1,5 мг/кг маси, МНК:

ДР — 1,5 мг/кг, Fe₃O₄ — 3 мг/кг. РГТ та ін'єкції препаратів у хвостову вену тварин об'ємом 0,3 мл в розчині 0,9% NaCl починали на 3-тю добу після перещеплення пухлини і проводили один раз у дві доби. Локальне неоднорідне ЕО пухлини тварин проводили експериментальним прототипом апарата “Магнітерм” (“Радмір”, Україна) з магніто-дипольним аплікатором, що мав голчатий локалізатор та неодимовий постійний магніт з максимальною магнітною індукцією ПМП 0,4 Тл на відстані 8 мм від кінця диполів та частотою ЕО 70 МГц з вихідною потужністю 75 Вт. Весь курс складався з п'яти ін'єкцій та п'яти сеансів ЕО та впливу ПМП. Контроль температури здійснювали волоконно-оптичним термометром ТМ-4 (“Радмір”, Україна). Температура всередині пухлини не перевищувала 38 °С.

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

Строк спостереження за тваринами становив 90 діб. Об'єм пухлини заміряли і розраховували як описано в [5].

Для оцінки нелінійної динаміки росту пухлин тварин використовували фактор росту φ та коефіцієнт гальмування пухлини κ [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. Показники виживаності обчислювали за Kaplan–Mejer. Результати порівнювали за допомогою logrank критерію [7].

Для аналізу даних використовували пакет прикладних програм Statistica 6.0 та Prism 4.0.

Аналіз петель гістерезису та спектрів ЕПР (рис. 1, 2, табл. 1) свідчить про те, що досліджені зразки МНК, Fe₃O₄, ДР 1 та ДР 2 були магнітом'якими феромагнетиками. Офіційний (ОФ) ДР мав властивості діамагнетика. Більший магнітний момент насичення та площу петлі магнітного гістерезису мали зразки МНК та ДР, синтез або активацію яких було проведено при індукції ПМП в реакторі 8 мТл, проте коерцитивна сила при тому ж значенні індукції ПМП зменшувалася. Для Fe₃O₄ 2 відносно Fe₃O₄ 1 спостерігалось підвищення магнітного моменту насичення, коерцитивної сили та зменшення площі петлі магнітного гістерезису. Стосовно отриманих результатів спектрів ЕПР при 38 °С, то слід відмітити однакову для обох досліджених зразків МНК величину *g*-фактору — 2,43. При

Таблиця 1. Магнітні характеристики зразків при 38 °С

Показник	МНК 1	МНК 2	Fe ₃ O ₄ 1	Fe ₃ O ₄ 2	ДР 1*	ДР 2*
Індукція ПМП при синтезі або активації в реакторі, мТл	5	8	5	8	5	8
Петля магнітного гістерезису						
Магнітний момент насичення, m_S , емо/г	8,55	10,5	31,8	41,6	0,05	0,37
Коерцитивна сила, H_C , Е	13,1	4,4	15,2	18,62	30,1	24,8
Площа петлі гістерезису, ерг/г	136,3	1135,4	5613,3	1657	17	36,7
Спектр ЕПР						
<i>g</i> -фактор	2,43	2,43	2,65	2,65	—	—
Концентрація парамагнітних центрів, мл ⁻¹ , $\times 10^{19}$	12,1	4,36	3,77	4,18	—	—

*ОФ ДР діамагнетик, питомий магнітний момент $m = -1,44$ емо/г, при 3000 Е.

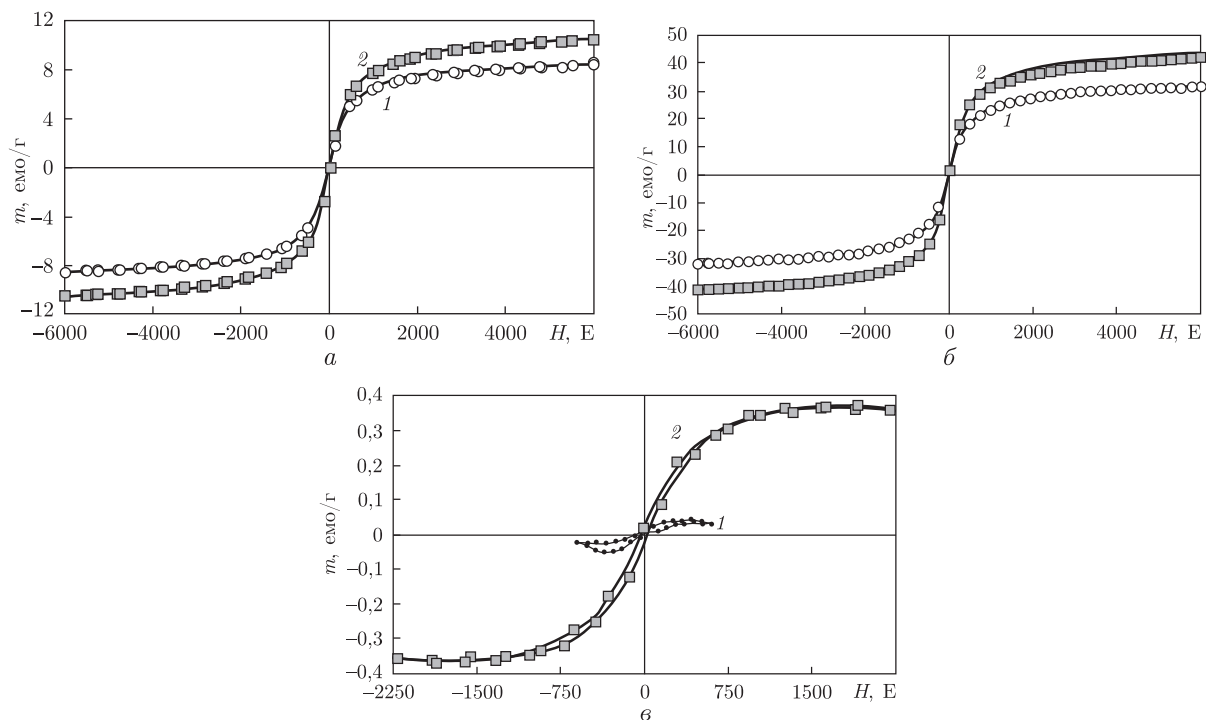


Рис. 1. Петлі гістерезису МНК (а), Fe_3O_4 (б) та ДР (в) при 38°C .
 H — напруженість магнітного поля; m — магнітний момент.
 Індукція ПМП (B) при активації/синтезі в реакторі: 1 — 5 мТл; 2 — 8 мТл

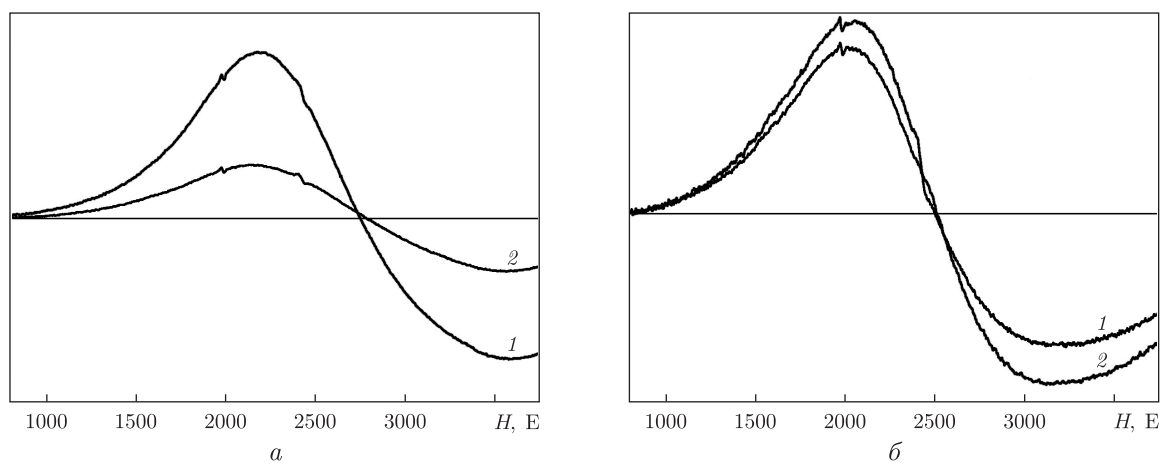


Рис. 2. Спектри ЕПР МНК (а) та Fe_3O_4 (б) при 38°C . H — напруженість магнітного поля. Індукція ПМП (B) при активації/синтезі в реакторі: 1 — 5 мТл; 2 — 8 мТл

цьому кількість парамагнітних центрів у МНК 2 була у 2,8 раза меншою, ніж у МНК 1. Останнє, як можна припустити, пояснюється тим, що сигнал ЕПР від ДР при 38°C не було зареєстровано, на відміну від раніше проведених досліджень ЕПР при -196°C [8]. Реєстрували сигнал ЕПР лише від наночастинок оксиду заліза, в яких g -фактор дорівнював 2,65, а кількість парамагнітних центрів, на відміну від МНК, була більшою на 10% у зразків після активації в реакторі при індукції ПМП 8 мТл.

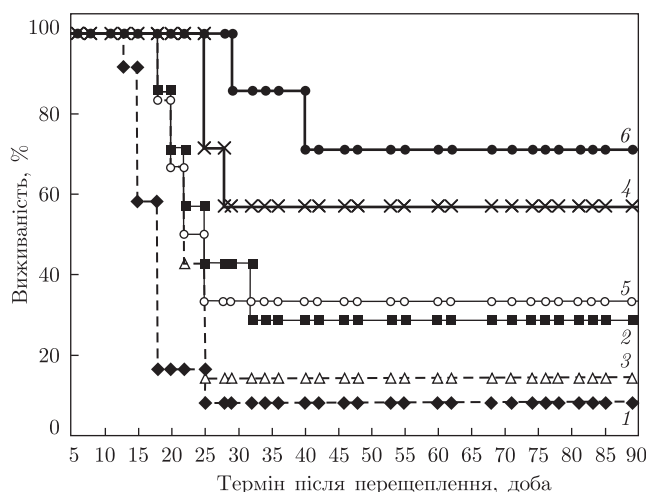


Рис. 3. Вживаність щурів з карциносаркомою Уокер-256: 1 – контроль; 2 – ОФ ДР; 3 – МНК 1; 4 – МНК 2; 5 – МНК 1 + ПМП + ЕО; 6 – МНК 2 + ПМП + ЕО

У табл. 2 наведені результати впливу МНК при дії ПМП та ЕО на нелінійну динаміку росту карциносаркоми Уокер-256 з 3-ї по 15-ту добу після перещеплення пухлини. Згідно з одержаними даними, має місце статистично достовірні різниця між протипухлинним ефектом МНК 1 і МНК 2 як без дії, так і після сумісної дії ПМП та ЕО. Протипухлинний вплив МНК 2 на основі розрахунку коефіцієнта гальмування росту пухлини в першому та другому випадках був відповідно на 16,5 та 19% більшим, ніж при МНК 1. Тобто МНК 2 мав більший протипухлинний ефект, ніж МНК 1.

При порівнянні даних щодо впливу МНК і самостійної протипухлинної дії ОФ ДР на основі аналізу коефіцієнта гальмування росту пухлини варто відмітити, що лише в 6-й групі тварин після сумісної дії МНК 2 з ПМП та ЕО зафіксовано більший коефіцієнт гальмування росту пухлини на 15,5%. Подальші спостереження за змінами розміру пухлин до 22-ї доби після її перещеплення засвідчили незмінність вищенаведених тенденцій коефіцієнта гальмування росту пухлини, незважаючи на те що в 1–4-й групах була зафіксована часткова загибель тварин з великими розмірами пухлин.

На рис. 3 наведені результати розрахунку виживаності. Кількість тварин, що вижили після терапії при використанні МНК 2 на 90-ту добу після перещеплення пухлини, у процент-

Таблиця 2. Вплив нанокмплесів з різними магнітними властивостями при дії постійного магнітного поля та електромагнітного опромінення на нелінійну динаміку росту карциносаркоми Уокер-256

Група тварин	Серія дослідів	Параметр	
		Фактор росту пухлини, φ , доба ⁻¹	Коефіцієнт гальмування росту пухлини, κ , відн. од.
1	Контроль	$0,43 \pm 0,01$	1,00
2	ОФ ДР	$0,32 \pm 0,01^1$	1,35
3	МНК 1	$0,40 \pm 0,01^{1,2}$	1,09
4	МНК 2	$0,33 \pm 0,02^{1,3}$	1,31
5	МНК 1 + ПМП + ЕО	$0,34 \pm 0,01^{1,3}$	1,27
6	МНК 2 + ПМП + ЕО	$0,28 \pm 0,02^{1,3,5}$	1,56

¹Статистично значущі відмінності порівняно з контролем, $p < 0,05$.

^{2,3,5}Статистично значущі відмінності порівняно з 2, 3, 5-ю групами тварин, $p < 0,05$.

ному відношенні була в 4 рази вищою, ніж після дії МНК 1. При цьому криві виживаності за 3 міс. спостереження статистично достовірно відрізнялися згідно з результатами logrank тесту ($\chi^2 = 4,92$, $p = 0,027$). Після комбінованої дії МНК 2, ПМП та ЕО відсоток тварин, що вижили на 90-ту добу експерименту, був у 2,1 раза вищим, ніж після аналогічної терапії, але із застосуванням МНК 1. Різниця між вказаними вище показниками виживаності також була статистично достовірною за критерієм logrank тесту ($\chi^2 = 4,00$, $p = 0,045$). Також виживаність тварин після комбінованої дії МНК 2, ПМП та ЕО була у 2,5 раза вищою, ніж після дії ОФ ДР, та у 8,6 раза вищою, ніж у тварин із контрольної групи. Дані показники виживаності тварин за 3 міс. також статистично достовірно відрізнялися згідно з результатами logrank тесту ($\chi^2 = 10,65$, $p = 0,001$).

Тобто, як і в дослідженнях нелінійної динаміки росту карциносаркоми Уокер-256, використання МНК 2 у поєднанні з дією ПМП та ЕО (тварини 6-ї групи) ініціювало найбільший позитивний ефект, але вже в інтегральному аспекті впливаючи на тривалість життя тварин. Спостерігалася статистично достовірна різниця між протипухлинним ефектом МНК 1 і МНК 2 як без дії, так і після сумісної дії ПМП та ЕО. Також слід зазначити, що отримані дані виживаності тварин відносно контрольної групи були вищими порівняно з отриманими при дослідженні моноефекту гіпертермії при 43 °С, яке проводилося в роботі [9].

Результати дослідження свідчать про те, що найвищими протипухлинний ефект та виживаність тварин були при використанні МНК 2 з більшими магнітним моментом насичення та площею петлі магнітного гістерезису при сумісній дії ПМП й ЕО в умовах помірної індукційної магнітотермії при температурі до 38 °С. Слід зазначити, що збільшення площі петлі магнітного гістерезису в МНК 2 порівняно з МНК 1 характеризувало те, що в ньому поглиналась більша кількість електромагнітної енергії поля, яка частково переходила в тепло [10].

Виходячи з цього виникає питання, яким чином взаємопов'язані досліджені магнітні та біологічні властивості? Імовірна відповідь на питання може бути викладена на підставі відомих фактів, що в злоякісних пухлинах має місце підвищена просторово-часова гетерогенність судинної мережі та швидкості кровотоку. Внаслідок цього оксигенація та концентрація АТФ в об'ємі пухлини мають істотно виражену гетерогенність [11]. Також відомий факт існування впливу магнітних та електромагнітних полів на процеси підсилення дії протипухлинних препаратів внаслідок ініціації активними формами кисню пошкоджень ДНК та апоптозу і некрозу в пухлинних клітинах [12]. Тому, згідно з даними роботи [13], можна припустити, що комбінований вплив МНК, ПМП та ЕО, імовірно, сприяв ініціації зміни в детермінованих та стохастичних процесах редокс-сигналізації не лише на основі молекулярних зв'язків, а і за допомогою просторового розподілу градієнтів ендogenous електромагнітних полів між наночастинками [14] у злоякісних клітинах. Це впливало на кінетику окисно-відновлювальних реакцій вільних радикалів та процеси перенесення електронів в електрон-транспортних ланцюгах мітохондрій на основі ефектів магнітного резонансу в пухлинних тканинах, гальмуючи ріст експериментальних пухлин, та, можливо, сприяло підвищенню виживаності тварин з карциносаркомою Уокер-256. Про достатню імовірність цього припущення свідчать результати безпосередніх досліджень ЕПР МНК (див. рис. 2, табл. 1).

Таким чином, встановлено, що поряд із раніше відомим фактом залежності ефекту магнітної нанотерапії від зовнішніх параметрів ПМП й ЕО злоякісних пухлин [15] існує також залежність від величини власних магнітних параметрів МНК в умовах помірної індукційної гіпертермії до 38 °С в пухлині. В прикладному аспекті це відкриває перспективи для нас-

тупного впровадження технології магнітної нанотерапії в комбінованих схемах лікування онкологічних хворих.

1. *Atiji M. M.* Nanotechnology for Cancer Therapy. – Boca Raton: CRC Press, 2007. – 817 p.
2. *Орел В., Дзятковская Н., Романов А.* Магнитная нанотерапия рака. Т. 1. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2013. – 224 с.
3. *Salikhov K. M., Molin Y. N., Sagdeev R. Z., Buchachenko A. L.* Spin polarization and magnetic effects in radical reactions. – Amsterdam: Elsevier, 1984. – 419 p.
4. *Gielen M., Tiekink E. R.* Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents – the use of metals in medicine. – Chichester: Wiley, 2005. – 598 p.
5. *Giuliani F. C., Kaplan N. O.* New doxorubicin analogs active against doxorubicin-resistant colon tumor xenografts in the nude mouse // *Cancer research.* – 1980. – **40**. – P. 4682–4687.
6. *Эмануэль Н. М.* Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. – Москва: Наука, 1977. – 419 с.
7. *Kaplan E. L., Meier P.* Nonparametric Estimation from Incomplete Observations // *J. Amer. Statist. Assoc.* – 1958. – **53**, No 282. – P. 457–481.
8. *Орел В. Е., Шевченко А. Д., Дзятковська І. І., Ніколов М. О., Романов А. В., Рихальський А. Ю., Бурлака А. П., Лукін С. М., Дзятковська Н. М., Щепотін І. Б.* Порівняльний аналіз магнітних характеристик та протипухлинного ефекту наноконструкцій з наночастинок оксидів заліза та доксорубіцину при радіочастотній гіпертермії карциносаркоми Уокер-256 // *Доп. НАН України.* – 2013. – № 2. – С. 177–183.
9. *Shah S. A., Jain R. K., Finney P. L.* Enhanced metastasis formation by combined hyperthermia and hyperglycemia in rats bearing Walker 256 carcinosarcoma // *Cancer Lett.* – 1983. – **19**, Iss. 3. – P. 317–323.
10. *Shavel A., Rodríguez-González B., Spasova M. et al.* Synthesis and Characterization of Iron/Iron Oxide Core/Shell Nanocubes // *Adv. Funct. Mater.* – 2007. – **17**. – P. 3870–3876.
11. *Осинский С., Ваупель П.* Микрофизиология опухолей. – Киев: Наук. думка, 2009. – 254 с.
12. *Ghodbane S., Lahbib A., Sakly M., Abdelmelek H.* Bioeffects of Static Magnetic Fields: Oxidative Stress, Genotoxic Effects, and Cancer Studies [Електронний ресурс] // *BioMed Res. Int.* – 2013. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763575/>.
13. *Орел В. Э., Грабовой А. Н., Романов А. В., Харкевич Н. А., Щепотин И. Б.* Состояние митохондрий клеток карциномы легких Льюис при воздействии магниточувствительного наноконструктивного комплекса и радиочастотной гипертермии // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* – 2013. – № 4. – С. 479–482.
14. *Cohen A. E.* Nanomagnetic Control of Intersystem Crossing // *J. Phys. Chem.* – 2009. – **113**. – P. 11084–11092.
15. *Orel V. E., Dzyatkovskaya N. N., Kruchkov E. I., Nikolov N. A., Rykhalskiy A. Y. et al.* The Effect of the Inhomogeneous Magnetic Fields on the Antitumor Activity of Magnetic Nanotherapy: Proc. of 2014 IEEE XXXIV Intern. Sci. Conf. Electronics and Nanotechnology (ELNANO). – Heidelberg: Springer, 2014. – P. 329–333.

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
Інститут фізики напівпровідників
ім. В. Є. Лашкарьова НАН України, Київ

Надійшло до редакції 06.06.2014

**В. Э. Орел, А. Д. Шевченко, А. Ю. Рыхальский, А. В. Романов,
А. П. Бурлака, С. Н. Лукин, член-корреспондент НАН Украины Е. Ф. Венгер,
Е. П. Сидорик, И. Б. Щепотин**

Магнитная нанотерапия животных с карциносаркомой Уокер-256

В экспериментах на животных обнаружена зависимость противоопухолевого эффекта магнитной нанотерапии от магнитных параметров магниточувствительного наноконплекса (МНК), в состав которого входили наночастички Fe_3O_4 и противоопухолевый препарат доxorубицин, при совместном локальном облучении постоянным магнитным и электромагнитным полями карциносаркомы Уокер-256. Противоопухолевый эффект и выживаемость животных были наибольшими при использовании МНК с большими магнитным моментом насыщения и площадью петли магнитного гистерезиса и меньшей коэрцитивной силой. Температура внутри опухоли не превышала $38^\circ C$. Полученные результаты могут быть использованы для лечения онкологических больных.

**V. E. Orel, A. D. Shevchenko, O. Yu. Rykhalskyi, A. V. Romanov,
A. P. Burlaka, S. N. Lukin,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine E. F. Venger, E. P. Sydoryk,
I. B. Schepotin**

Magnetic nanotherapy of animals with carcinosarcoma Walker-256

Our experiments have shown that the antitumor activity of magnetic nanotherapy depends on the magnetic nanocomplex (MNC) parameters. MNC consisted of nanoparticles Fe_3O_4 and antitumor drug doxorubicin. Tumor-transplanted animals were subjected to the irradiation by permanent magnetic and electromagnetic fields. The highest antitumor activity and the survival rate of animals were observed after the treatment by MNC with the larger magnetic moment of saturation, and the large area square of the hysteresis loop and the lower coercivity. Intratumoral temperature does not exceed $38^\circ C$. The obtained results can be used to treat cancer patients.