

**В. Е. Орел, академік НАН України Б. О. Мовчан, І. І. Дзятковська, М. О. Ніколов, А. В. Романов, Ю. Г. Мельник, Н. М. Дзятковська, А. П. Бурлака, С. М. Лукін, І. Б. Щепотін**

## **Аналіз впливу механо- та магнетохімічно синтезованого магніточутливого комплексу на основі наночастинок оксиду заліза і доксорубіцину та електромагнітного опромінення на тварин з карциномою Герена**

*Дослідження на експериментальній моделі карциноми Герена показали, що механо- та магнетохімічно синтезований магніточутливий комплекс (МК) на основі наночастинок  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  з КСІ та доксорубіцину виявляє більший протипухлинний ефект, ніж офіційна доксорубіцин та подібний механохімічно синтезований МК, при наступному зовнішньому локальному електромагнітному опроміненні пухлин тварин при помірній гіпертермії. Найвища виживаність тварин-пухлиноносців встановлена в експериментах, коли після введення механохімічно або механо- та магнетохімічно синтезованого МК пухлину піддавали локальному електромагнітному опроміненню.*

Експериментальні дослідження, проведені за останнє десятиріччя, свідчать про перспективу використання як протипухлинних препаратів магніточутливих комплексів (МК) на основі наночастинок оксиду заліза магнетиту ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), маггеміту ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) та протипухлинного антибіотика антрациклінового ряду доксорубіцину (ДР). Основна теоретична привабливість цього підходу полягає в можливості дистанційно керованої цілеспрямованої доставки МК і наступне підсилення його протипухлинної активності електромагнітним полем (ЕМП) за рахунок гіпертермії (ГТ) [1, 2]. Разом з тим пілотні клінічні дослідження з використанням наночастинок, проведені в ряді країн світу, свідчать про неістотний прогрес в результатах комплексного лікування онкологічних хворих [3].

Основні причини, які гальмують широке впровадження в клінічну практику комплексного лікування з використанням МК при електромагнітній ГТ, можуть бути зведені до нижченаведеного переліку. Незначна поверхнева селективність мікро- та наночастинок поміж злоякісними та нормальними клітинами; електромагнітна ГТ МК в злоякісних пухлинах при температурах вище  $41^\circ\text{C}$  може супроводжуватись формуванням термотолерантності та терморезистентності на клітинному рівні внаслідок ініціювання синтезу білків теплового шоку; імовірно виникнення побічних ефектів у серцево-судинній системі пацієнтів внаслідок обмеженої переносимості ними сеансу ГТ при температурах вище  $41^\circ\text{C}$ ; сповільнена біодеструкція наночастинок в організмі і побічні ефекти накопичення їх у печінці, селезінці, м'язах та інших органах [4].

В основі вирішення нами вищезазначених проблем лежали три відомі фундаментальні наукові концепції. Перша — гіпоксія є однією з найбільш характерних ознак злоякісних пухлин та обумовлена значними структурними та функціональними аномаліями гетерогенної внутрішньопухлинної мікроциркуляції [5]. Друга — нелінійні динамічні процеси, ініційовані комбінованою дією механохімічного впливу та електромагнітного поля, можуть супроводжуватись спіновими ефектами в хімічних реакціях [6]. Це може сприя-

ти ланцюговому утворенню вільних радикалів, за участю активних форм кисню та азоту, в процесі хіміотерапії ДР та збільшувати вірогідність пошкодження препаратом ДНК. І нарешті, третя — електромагнітна помірна ГТ, ініційована неоднорідним ЕМП, підвищує кровоток і оксигенацію в пухлині та її судинну проникність для лікувальних препаратів [7].

Виходячи з вищезазначеного, нашою метою було експериментальне дослідження можливості збільшення ефективності протипухлинної дії МК на основі наночастинок оксиду заліза і ДР після механо- і/або магнетохімічного синтезу та електромагнітного опромінення (ЕО) тварин-пухлиноносіїв.

Досліджували МК на основі наночастинок оксиду заліза  $Fe_3O_4$  з КСІ діаметром 20–40 нм отриманих із застосуванням технології електронно-променевого випаровування та конденсації у вакуумі неорганічних матеріалів [8], та ДР виробництва Пфайзер Італія С.р.л., Італія.

Для дослідження мікроструктури і проведення енергодисперсної спектроскопії складових МК (С, О, К, Сl, Fe) використовували сканувальний електронний мікроскоп CamScan S-4 (Великобританія) з енергодисперсійною приставкою INCA. Гетерогенність ( $G$ ) мікроструктури наносистеми оцінювали згідно з [9].

Спектри ЕПР реєстрували на модернізованому спектрометрі марки PE1307 при температурі рідкого азоту 77 К у циліндричному резонаторі з модою H011 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 500 мл.

Дослідження впливу механо- і/або магнетохімічно синтезованого МК та наступного ЕО тварин на протипухлинну активність комплексу та виживаність тварин було проведено на 56 неінbredних щурах-самках масою ( $100 \pm 15$ ) г розводки віварію Національного інституту раку з перещепленою карциномою Герена. Трансплантацію пухлинних клітин карциноми Герена здійснювали введенням щурам у праве стегно 30% суспензії клітин в об'ємі 0,4 мл в середовищі 199.

Тварини були розподілені на сім груп, кожна з яких складалася з восьми особин: I — контроль (без введення ДР, МК і ЕО); II — введення ДР; III — введення ДР + ЕО; IV — введення механохімічно синтезованого МК; V — введення механо- та магнетохімічно синтезованого МК; VI — введення механохімічно синтезованого МК + ЕО; VII — введення механо- та магнетохімічно синтезованого МК + ЕО.

Синтез наноконструкції проводили таким чином: протипухлинний препарат ДР та магнеточутливий наноносій  $Fe_3O_4$  піддавали механо- і/або магнетохімічному синтезу з інтенсивністю підводу механічної енергії 20 Вт/г та дії електромагнітного поля (частотою 40 МГц з вихідною потужністю 75 Вт) протягом 5 хв за допомогою механомагнітного реактора, виготовленого на основі мікрівібромліна “MMVE-005” (“Гефест”, Росія). Наноконструкцію синтезували за 20–40 хв перед введенням його тваринам.

ДР вводили тваринам у масовій концентрації 1,5 мг/кг, МК: 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 препаратів та ЕО починали на 3-тю добу після перещеплення пухлини і проводили один раз у дві доби. Весь курс складався з трьох ін'єкцій і/або трьох сеансів ЕО. Строк спостереження за тваринами становив 90 днів.

У зоні пухлини розташовували постійний магніт з магнітною напруженістю 1990 А/м для локалізації МК у пухлинних клітинах. Наступне локальне ЕО пухлин проводили про-

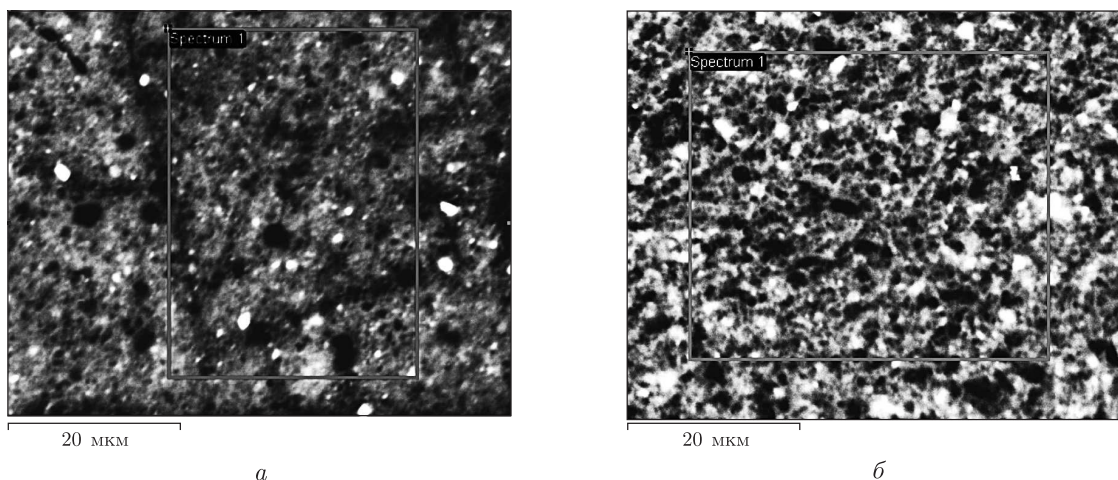


Рис. 1. Мікроструктура та гетерогенність МК: *a* — після механохімічного синтезу ( $G = 0,54 \pm 0,02$ ); *б* — після механо- та магнетохімічного синтезу ( $G = 0,47 \pm 0,03$ )

тягом 15 хв за допомогою прототипу апарату “Магнітерм” при вихідній потужності 100 Вт. При цьому внутрішньопухлинна температура не перевищувала 37,9 °С.

Для оцінки нелінійної динаміки росту пухлин тварин використовували фактор росту  $\varphi$  та коефіцієнт гальмування пухлини  $\kappa$  згідно з [10].

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 [11].

Статистичний аналіз вірогідності отриманих даних проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента, використовуючи комп’ютерну програму Statistica 6.0 з попередньою перевіркою гіпотези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова–Смірнова.

На рис. 1 наведено типові зміни мікроструктури та гетерогенності МК після різних типів синтезу. Аналіз одержаних даних свідчить про те, що після механо- та магнетохімічного синтезу структура МК зменшувала гетерогенність на 12% ( $p < 0,05$ ) відносно механохімічно синтезованого МК, але процентний ваговий склад окремих елементів МК не змінювався.

В механохімічно, механо- та магнетохімічно синтезованих МК реєстрували спектри ЕПР з *g*-факторами 2,31 та 2,64, тоді як характерними для наночастинок  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  є ЕПР спектри з *g*-факторами 2,0839 та 2,18838 [12], а для офіційного та механохімічно активованого ДР — 2,005; 2,003 та 1,97 [13]. Тобто збільшується потенційна можливість його біодеградації.

Згідно з результатами вивчення впливу МК та ЕО тварин на ріст карциноми Герена в період з 7-ї до 24-ї доби після перещеплення (табл. 1), у VII групі тварин, яким вводили механо- та магнетохімічно синтезований МК і одночасно проводили ЕО, фактор росту був найменшим ( $\varphi = 0,13 \pm 0,03$ ), а коефіцієнт гальмування пухлин — найбільшим ( $\kappa = 2,43$ ).

Найвища виживаність тварин (рис. 2) спостерігалась при одночасному застосуванні МК і ЕО в VI та VII групах, вона перевищувала виживаність тварин з контрольної групи на 77%, а тварин з IV групи, яким вводили тільки механохімічно синтезований МК, — на 50%. При введенні механо- і магнетохімічно синтезованого МК (V група) виживаність тварин збільшувалась на 39% порівняно з IV групою, але все ж була меншою на 20% порівняно з VI і VII групами тварин. Виживаність тварин III та V груп була однаковою.

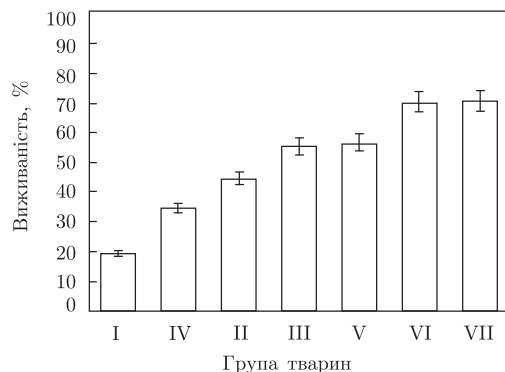


Рис. 2. Вживаність тварин з карциною Герена: I – контроль (без введення ДР, МК і ЕО); II – введення ДР; III – введення ДР + ЕО; IV – введення механохімічно синтезованого МК; V – введення механо- та магнетохімічно синтезованого МК; VI – введення механохімічно синтезованого МК + ЕО; VII – введення механо- та магнетохімічно синтезованого МК + ЕО

Таблиця 1. Коефіцієнти нелінійної динаміки росту карциноми Герена у період з 7-ї до 24-ї доби після перещеплення

Група тварин	Параметр	
	$\varphi$ , доба <sup>-1</sup> ( $M \pm m$ )	$\kappa$
I – контроль (без введення ДР, МК і ЕО)	0,31 ± 0,04	1
IV – введення механохімічно синтезованого МК	0,28 ± 0,04	1,08
II – введення ДР	0,18 ± 0,01*	1,66
VI – введення механохімічно синтезованого МК + ЕО	0,16 ± 0,01*	1,94
III – введення ДР + ЕО	0,16 ± 0,02*	1,89
V – введення механо- та магнетохімічно синтезованого МК	0,16 ± 0,01*	1,88
VII – введення механо- та магнетохімічно синтезованого МК + ЕО	0,13 ± 0,03*	2,43

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

Підвищення протипухлинної активності МК, найбільш вірогідно, обумовлено двома ефектами. По-перше, локальним ефектом ініціювання неоднорідним ЕМП спінової конверсії та ініціації вільнорадикальних реакцій, за участю активних форм кисню та азоту, в механо- та магнетохімічно синтезованому МК [6], що підвищувало його селективну протипухлинну активність. По-друге, можливим ефектом на основі сценарію Помо–Манневілля [14], тобто переходу від характерного для злякисного процесу хаосу в організмі тварини-пухлиноносія до порядку внаслідок поглинання неоднорідного ЕМП механо- та магнетохімічно синтезованим МК з підвищеними  $g$ -факторами, що могло зменшувати типovu для злякисного процесу гіпоксію в пухлинах та структурні й функціоналі аномалії гетерогенної внутрішньопухлинної мікроциркуляції [5]. Подальше поглиблене вивчення протипухлинної ефективності МК на фоні неоднорідного ЕМП може в перспективі сприяти удосконаленню лікувальних програм для онкологічних хворих.

Таким чином, дослідження на експериментальній моделі карциноми Герена показали, що механо- та магнетохімічно синтезований МК мав більший протипухлинний ефект, ніж офіційний ДР та подібний механохімічно синтезований МК, за наступного зовнішнього локального ЕО пухлин тварин. Вживаність тварин-пухлиноносіїв була найвищою в експериментах, коли після введення механохімічно або механо- та магнетохімічно синтезованого МК пухлину піддавали локальному опроміненню.

Автори висловлюють подяку С. М. Романенку за допомогу в проведенні досліджень мікроструктури магніточутливого комплексу.

1. Peng X. H., Qian X., Mao H. et al. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy // Int. J. Nanomedicine. – 2008. – **3**, No 3. – P. 311–321.
2. Chekhun V. F., Todor I. N., Lukyanova N. Y. et al. The use of nanoferrimagnetics to increase the cytotoxic effect of antitumor drugs // Exp. Oncol. – 2009. – **31**, No 3. – P. 163–167.
3. 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. – **22**, No 4. – P. 319–325.
4. Орел В. Э., Смолянка И. И., Дзятковская И. И. Радиочастотная терапия в онкологии // Журн. АМН України. – 2009. – **15**, № 2. – С. 289–309.
5. Осинский С. П., Ваупель П. Микрофизиология опухолей. – Киев: Наук. думка, 2009. – 254 с.
6. Бучаченко А. Л. Магнитные и спиновые эффекты в химических реакциях // Отв. ред. Ю. Н. Молин. – Новосибирск: Наука, 1978. – 286 с.
7. Orel V. E., Romanov A. V. The Effect of Spatially Inhomogeneous Electromagnetic Field and Local Inductive Hyperthermia on Nonlinear Dynamics of the Growth for Transplanted Animal Tumors // Nonlinear Dynamics / Ed. by T. Evans. – Croatia: INTECH, 2010. – P. 285–308.
8. Мовчан Б. А. Электронно-лучевая нанотехнология и новые материалы в медицине – первые шаги // Вісн. фармакології і фармації. – 2007. – № 12. – С. 5–13.
9. Orel V., Kozarenko T., Galachin K. et al. Nonlinear Analysis of Digital Images and Doppler Measurements for Trophoblastic Tumor // Non Dyn., Phys. and Life Sci. – 2007. – No 11. – P. 309–331.
10. Эмануэль Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. – Москва: Наука, 1977. – 419 с.
11. Резников О. Проблемы этики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісн. НАН України. – 2001. – № 1. – С. 5–7.
12. Köseoglu Y., Ysildiz F., Kim D. K. et al. EPR studies on Na-oleate coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles // Phys. status solidi. – 2004. – **1**, No 12. – P. 3511–3515.
13. Orel V., Kudryavets Y., Bezdenezhnik N., Danko M., Khronovskaya N., Romanov A., Dzyatkovskaya N., Burlaka A. Mechanochemically activated doxorubicin nanoparticles in combination with 40 MHz frequency irradiation on A – 549 lung carcinoma cells // Drug Delivery. – 2005. – **12**. – P. 171–178.
14. Орел В. Э. Хаос и рак, механохимия, механоэмиссия. – Киев: АОЗТ “Телеоптик”, 2002. – 296 с.

Національний інститут раку МОЗ України, Київ  
 Інститут електрозварювання ім. Є. О. Патона  
 НАН України, Київ  
 Інститут експериментальної патології,  
 онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького  
 НАН України, Київ

Надійшло до редакції 01.03.2010

**V. E. Orel**, Academician of the NAS of Ukraine **B. O. Movchan**, **I. I. Dzyatkovska**,  
**M. O. Nikolov**, **A. V. Romanov**, **Yu. G. Mel'nik**, **N. M. Dzyatkovska**,  
**A. P. Burlaka**, **S. M. Lukin**, **I. B. Shchepotin**

**Analysis of the influence of a mechano- and magnetochemically synthesized magnetosensitive complex on the basis of nanoparticles of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, doxorubicin, and electromagnetic irradiation on animals with Guerin carcinoma**

*The research of animals with Guerin carcinoma has shown that a mechano- and magnetochemically synthesized magnetosensitive complex (MC) on the basis of nanoparticles of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> with KCl and doxorubicin has a greater antitumor effect than conventional doxorubicin and a similar mechanochemically synthesized MC with the following local electromagnetic irradiation and mild hyperthermia of animal tumors next. Survival rate of animals with tumors was most in experiments after the introduction of mechanochemically or mechano- and magnetochemically synthesized MC with the following irradiation of animal tumors.*