

¹Національний інститут раку МОЗ України, Київ²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ³Інститут металофізики ім. Г.В. Курдюмова НАН України, Київ

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ОПРОМІНЕННЯ ТА МАГНІТОЧУТЛИВОГО НАНОКОМПЛЕКСУ НА КЛІТИНИ АДЕНОКАРЦИНОМИ

148



В.Е. Орел¹, Н.О. Безденежних²,
А.Д. Шевченко³, М.О. Ніколов¹,
А.В. Романов¹, Н.М. Храновська¹,
О.В. Скачкова¹, Ю.Й. Кудрявцев²,
І.Б. Щепотін¹

Адреса:

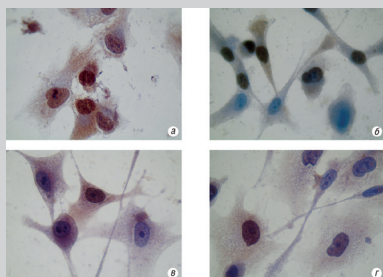
Орел Валерій Еммануїлович

03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43

Національний інститут раку МОЗ України

E-mail: v-orel@i.com.ua

Тел.: (044) 257-60-68



Ключові слова: клітини аде-
нокарциноми, магніточутливий
нанокомплекс, парамагнітний
доксорубіцин, електромагнітне
опромінення.

Проведено експериментальне дослідження можливості збільшення ефективності протипухлинної дії магніточутливого нанокомплексу (МК) на основі наночастинок оксиду заліза і доксорубіцину (ДР) при електромагнітному опроміненні (ЕО) клітин аденокарциноми. Використовували клітини мишей лінії LL та клітини людини А-549. У роботі досліджували вплив МК на основі наночастинок Fe_3O_4 з КСІ та ДР при ЕО з частотою 40 МГц. Підрахунок живих та загинувших клітин здійснювали за допомогою камери Горяєва. Для аналізу індукції апоптозу та розподілу пухлинних клітин за фазами клітинного циклу проводили проточну цитофлуориметрію. Також за допомогою імуноцитохімічного методу досліджували експресію топоізомерази II. Парамагнітний ДР, який входив до складу МК, мав більший цитотоксичний ефект, ніж офіційний ДР, а додаткове ЕО ініціювало подальше підвищення загибелі клітин LL та А-549. Комбінована дія ЕО та МК найбільш істотно збільшувала кількість апоптотичних клітин LL. Для клітин А-549 найбільший рівень індукції апоптозу спостерігали після використання МК без ЕО. Комбінована дія ЕО з одним із препаратів — офіційним ДР, парамагнітним ДР або МК — ініціювала суттєве зменшення процентного розподілу клітин LL та А-549 в S-фазі клітинного циклу. Обробка клітин парамагнітним ДР або МК більш ефективно знижувала експресію топоізомерази II в клітинах А-549, ніж офіційний ДР.

ВСТУП

Експериментальні та клінічні дослідження, проведені за останнє десятиріччя, свідчать про перспективу використання в якості протипухлинних препаратів магніточутливих нанокомплексів (МК) на основі наночастинок оксиду заліза магнетиту (Fe_3O_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 й наступне підсилення його протипухлинної активності електромагнітним опроміненням (ЕО) [4, 6].

Разом з цим пілотні клінічні дослідження, проведені в ряді країн світу з використанням наночастинок, свідчать про несуттєвий прогрес в результатах комплексного лікування онкологічних хворих. Основні проблеми, які гальмують широке впровадження в клінічну практику комплексного лікування онкологічних хворих з використанням МК при радіочастотній гіпертермії, можуть бути зведені до ниж-

ченаведеного переліку. Незначна поверхнева селективність мікро- та наночастинок поміж злоякісними та нормальними клітинами; радіочастотна гіпертермія МК, ініційована ЕО злоякісних пухлин при температурах понад 41°C , може супроводжуватися формуванням термотолерантності та терморезистентності на клітинному рівні внаслідок ініціювання синтезу білків теплового шоку; ймовірно виникнення побічних ефектів у серцево-судинній системі пацієнтів внаслідок обмеженої переносимості ними сеансу гіпертермії при температурах вище 41°C ; сповільнена біодеструкція наночастинок в організмі й побічні ефекти накопичення їх в печінці, селезінці, м'язах та інших органах [7].

В основі вирішення нами вищезазначених проблем лежали 2 відомі фундаментальні наукові концепції. Перша — гіпоксія є однією з найбільш характерних ознак злоякісних пухлин та обумовлена значними структурними та функціональними аномаліями гетерогенної внутрішньопухлинної мікро-

циркуляції крові [3]. Друга — нелінійні динамічні процеси, ініційовані комбінованою дією механохімічного впливу та електромагнітного поля, можуть супроводжуватися спіновими ефектами в хімічних реакціях [11]. Це може сприяти ланцюговому утворенню вільних радикалів за участі активних форм кисню та азоту в процесі хіміотерапії ДР та збільшувати вірогідність пошкодження препаратом ДНК.

Протягом останніх років дослідниками [8] було показано, що при обробці пухлинних клітин хімічними факторами, які призводять до дволанцюгових розривів ДНК, відбувається підвищення рівня експресії топоізомерази ІІа в пухлинних клітинах, і що це явище корелює зі збільшенням кількості пошкоджень ДНК. У той же час дослідження інших вчених [12] засвідчили, що наявність в пухлинних клітинах топоізомерази ІІа підвищує чутливість цих клітин до дії антрациклінів.

Виходячи з вищезазначеного, метою даної роботи було експериментальне дослідження можливості збільшення ефективності протипухлинної дії МК на основі наночастинок оксиду заліза і ДР при ЕО клітин аденокарциноми.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Культивування клітин.

У дослідженнях використовували клітини мишей лінії LL, отриманих з карциноми легень Льюїс, нормальні фібробласти та клітини людини А-549 (клітинна лінія з недрібноклітинного раку легень). Усі клітинні лінії отримані у клітинному банку ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Клітини культивували в повному поживному середовищі RPMI-1640 та DMEM з 10% сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37°C з використанням стерильного посуду (Сенте-Лаб, Україна). Зміну середовища проводили кожні 2–3 доби. Після того, як клітини утворювали на субстраті щільний моношар (3–4–4–та доба росту), здійснювали їх пересів, при цьому дисоціювали клітини за допомогою фосфатно-сольового буфера з 1 мМ ЕДТА (розчин Версену).

Магніточутливий наноконструкт.

У роботі досліджували препарати, отримані з використанням механомагнетохімічної технології [2]. В якості самостійних частин або складових препаратів було використано наночастинки оксиду заліза Fe₃O₄ з КСІ діаметром 20–40 нм, отримані із застосуванням технології електронно-променевого випаровування та конденсації в вакуумі неорганічних матеріалів [1], і ДР виробництва Пфайзер Італія С.р.л., Італія. Співвідношення у МК — ДР : Fe₃O₄ з КСІ = 1 : 2.

Магнітні характеристики препарату досліджували методом магнітометрії на вібраційному магнітометрі «Vibrating Magnetometer 7404 VSM» (фірма «Lake Shore Cryotronics, Inc.», США) в магнітних полях з напруженістю до 13 кЕ. Чутливість магнітометра становила 10⁻⁷ емо, що дозволяло виконувати виміри магнітного моменту на зразках масою до одиниць міліграмів. Масу досліджуваних зразків визначали за допомогою електронних мікроваг AB135-S/FACT з автокомпенсацією (фірма «METTLER TOLEDO», Швейцарія). Чутливість ваг становила 10⁻³ г.

Магнітні дослідження зразків препаратів наведено в табл. 1. Слід відзначити, що відібрані для дослідження препарати мали суттєво різні магнітні характеристики. Офіційний (ОФ) ДР — діаманетик, механомагнетохімічно активований парамагнітний (ПМ) ДР — парамагнетик та МК — м'який феромагнетик.

Електромагнітне опромінення.

Для локального просторово-неоднорідного ЕО використовували прототип апарату «Магнітерм» (Радмір, Україна). Параметри ЕО: частота — 40 МГц, вихідна потужність — 60 Вт. Аплікатор апарату — рамковий розмірами 2×2,5 см та профілем у формі дуги з радіусом кривизни 2,3 см [5].

Цитотоксичність.

Для визначення чутливості клітин до досліджуваних препаратів суспензію клітин висаджували на 96-лункові планшети в концентрації 5×10³–1×10⁴ клітин/лунку в 100 мкл повного поживного середовища. Через 24 год вносили препарати, інкубували клітини за стандартних умов 48 год, після чого фарбували клітини за допомогою МТТ-тесту (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide;

Thiazolyl blue) (SIGMA, США). Для цього в кожну лунку вносили по 10 мкл МТТ концентрацією 5 мг/мл та інкубували при 37°C у зволоженій атмосфері 3 год. Згодом планшети центрифугували (1500 об/хв протягом 5 хв), видаляли супернатант і додавали до кожної лунки по 50 мкл диметилсульфоксиду для розчинення кристалів формазану. Через 30 хв інкубації при кімнатній температурі визначали оптичну густину вмісту лунок при довжині хвилі 540 нм за допомогою мультилункового спектрофотометра Labsystems Multiskan PLUS (США) [9]. За допомогою даного методу було встановлено різні індекси цитотоксичності для досліджуваних препаратів. Отримані дані були використані для подальших досліджень, зокрема для визначення ефекту комбінованої дії ЕО та досліджуваних хіміопрепаратів. При цьому клітини вирощували в чашках діаметром 40 мм (2×10⁵ клітин на чашку) за стандартних умов протягом 24 год, після чого додавали досліджувані препарати та через деякий час опромінювали їх протягом 30 хв.

Підрахунок живих та загинувших клітин здійснювали за допомогою камери Горяєва через 48 год після опромінення, фарбували клітини трипановим синім та визначали кількість клітин за формулою:

$$A/80 \times 2 = X \times 10^6 \text{ клітин у 1 мл середовища,}$$

де А — кількість клітин, що була нарахована у камері Горяєва (у 5 квадратах), ×2 — розведення з трипановим синім (1 : 1).

Виходячи з раніше отриманих результатів у роботі [10] про більший цитотоксичний ефект механохімічно активованого ДР порівняно з ОФ ДР, для оптимального методичного підходу була визначена різни-

Таблиця 1 Магнітні характеристики зразків препаратів

№	Об'єкт дослідження	Магнітний момент насичення, емо/г	Напруженість магнітного поля для m _с H _{нас} , Е	Коерцитивна сила H _с , Е
1	ОФ ДР	діаманетик – 0,200	—	—
2	ПМ ДР	парамагнетик + 0,068	3000	—
3	МК	м'який феромагнетик 11,78	12000	45,66

Таблиця 2 Ефект протипухлинного впливу ЕО та МК на клітинну лінію LL

№ групи	Експеримент	Відсоток живих клітин, %
1	Контроль	100
2	ОФ ДР (0,25 мкг/мл)	21±2,0
3	ОФ ДР (0,25 мкг/мл)+ЕО	20±0,8
4	ПМ ДР (0,25 мкг/мл)	20±3,1
5	МК (0,25 мкг/мл)+ЕО	15±1,1*
6	ОФ ДР (0,05 мкг/мл)	27±2,1
7	ОФ ДР (0,05 мкг/мл)+ЕО	26±0,1
8	ПМ ДР (0,05 мкг/мл)	23±1,7
9	МК (0,05 мкг/мл)+ЕО	22±0,9*
10	ОФ ДР (0,025 мкг/мл)	33±2,8
11	ОФ ДР (0,025 мкг/мл)+ЕО	25±1,1*
12	ПМ ДР (0,025 мкг/мл)	32±0,9
13	МК (0,025 мкг/мл)+ЕО	27±0,5*
14	ОФ ДР (0,01 мкг/мл)	54±2,9
15	ОФ ДР (0,01 мкг/мл)+ЕО	48±0,7
16	ПМ ДР (0,01 мкг/мл)	46±3,1
17	МК (0,01 мкг/мл)+ЕО	45±2,0
18	ОФ ДР (0,005 мкг/мл)	75,4±1,6
19	ОФ ДР (0,005 мкг/мл)+ЕО	60,5±2,1*
20	ПМ ДР (0,005 мкг/мл)	64,3±2,4*
21	МК (0,005 мкг/мл)+ЕО	52,4±2,7*

*Статистично значуща відмінність порівняно з ОФ ДР (p<0,05).

ція протипухлинного впливу між механо-хімічно активованим ДР та ПМ ДР, який входив до складу МК. ПМ ДР та МК піддавали не лише механохімічному впливу, а й одночасному ЕО. Досліди на клітинних лініях аденокарцином LL, А-549 та нормальних фібробластах миші показали, що більший цитотоксичний та антипроліферативний ефекти мав ПМ ДР. Самостійно наночастинки Fe_3O_4 з КСІ практично не впливали як на пухлинні клітини, так і на нормальні.

Цитофлуориметрія.

Проводили проточну цитофлуориметрію для аналізу впливу ДР та ЕО на індукцію апоптозу та розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу. Проточну цитофлуориметрію виконували на приладі FACalibur («Бектон Дікінсон», США), обладнаному 2 лазерами: аргонним та гелій-неоновим, з довжиною хвиль 488 та 625 нм відповідно. Аналіз проводили за допомогою програми CellQuest. Для вимірювання флуоресценції йодиду пропідію застосовували

фільтр з максимумом пропускання при 600 нм та смугою пропускання 35 нм. За допомогою проточної цитофлуориметрії оцінювали відсоток клітин, які припадають на гіподиплоїдну зону гістограми вмісту ДНК.

Імуноцитохімія.

За допомогою імуноцитохімічного методу досліджували експресію топоізомери ІІ. При цьому фіксували досліджувані зразки за допомогою фіксуючого розчину протягом 2 год при температурі $-20^{\circ}C$, відмивали та наносили 1% розчин бичачого сироваткового альбуміну на 20 хв. Потім наносили антитіла на 60 хв, після чого застосовували систему візуалізації UltraVision LP Value Detection System. Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати дофарбовували за допомогою Nematohylin згідно Майєр та враховували результати мікроскопіювання.

Статистика.

Статистичний аналіз вірогідності отриманих даних проводили за допо-

могою t-критерію Стюдента, використовуючи комп'ютерну програму Statistica 6.0 з попередньою перевіркою гіпотези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова — Смірнова.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Цитотоксичність.

Для оцінки ефективності безпосереднього протипухлинного впливу МК та ЕО було проведено порівняльне дослідження з моноефектами ПМ й ОФ ДР та при комбінованому впливі останнього з ЕО. В табл. 2 представлено результати дослідження ефектів самостійного впливу хіміопрепаратів ОФ та ПМ ДР та комбінованого впливу хіміопрепаратів з ЕО на клітинну лінію LL. Аналізуючи наведені дані, можна відзначити, що ПМ ДР діє активніше в середньому на 12% на пухлинні клітини, ніж ОФ ДР. ЕО підвищує чутливість пухлинних клітин до дії протипухлинних агентів,

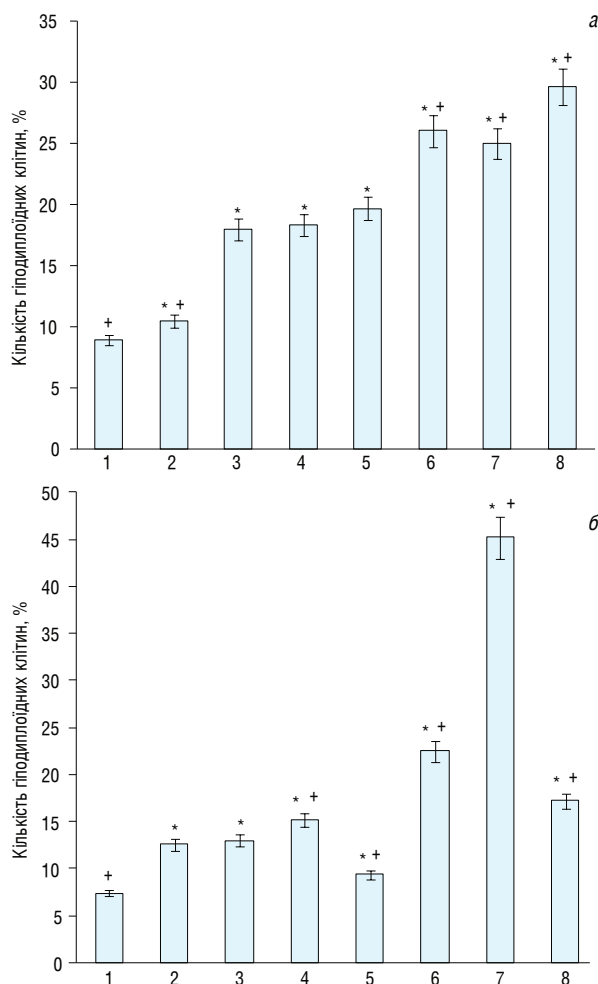


Рис. 1. Вплив ЕО і МК на індукцію апоптозу в пухлинних клітинах: а — LL; б — А-549. 1 — контроль (без впливу); 2 — ЕО; 3 — ОФ ДР; 4 — ОФ ДР+ЕО; 5 — ПМ ДР; 6 — ПМ ДР+ЕО; 7 — МК; 8 — МК+ЕО. * Статистично значуща відмінність порівняно з контролем ($p < 0,05$). + Статистично значуща відмінність порівняно з ОФ ДР ($p < 0,05$).

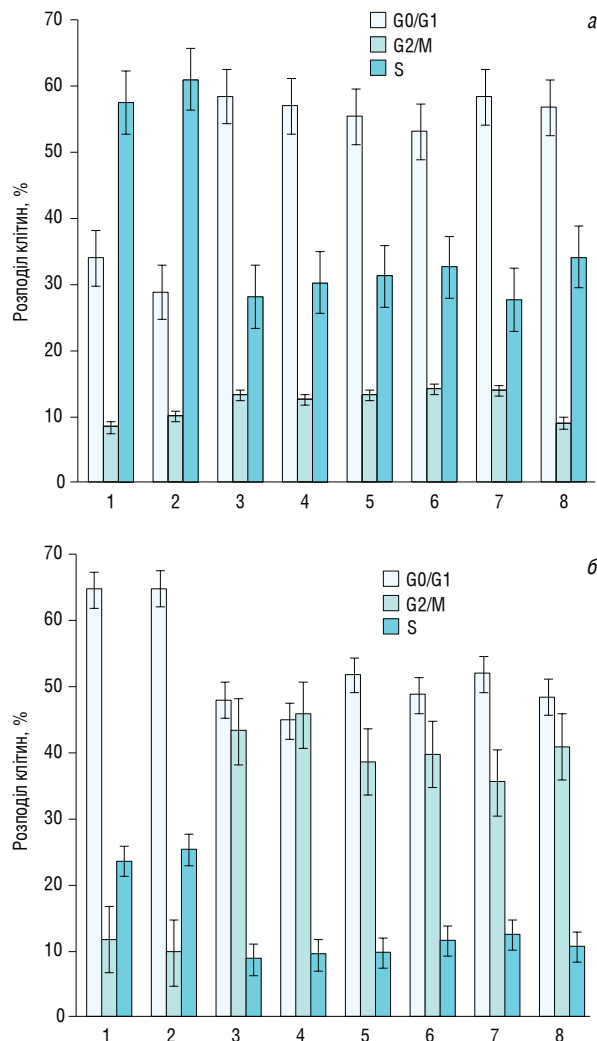


Рис. 2. Вплив ЕО і МК на розподіл за фазами клітинного циклу клітин: а — LL; б — А-549. 1 — контроль (без впливу); 2 — ЕО; 3 — ОФ ДР; 4 — ОФ ДР+ЕО; 5 — ПМ ДР; 6 — ПМ ДР+ЕО; 7 — МК; 8 — МК+ЕО

зокрема МК, у середньому на 23,3% у порівнянні з дією ОФ ДР. Така ж тенденція спостерігалася і при дослідженні комбінованого впливу модифікованих препаратів на клітини аденокарциноми людини А-549, тобто підвищувалася їх чутливість до антрациклінів під дією опромінення до 12%.

Для більш детального уявлення про чутливість пухлинних клітин до дії препаратів та ЕО було досліджено їх вплив на наявність апоптотичних клітин та ефектів розподілу за фазами клітинного циклу з використанням проточної цитофлуориметрії й змін експресії топоізомерази II.

Цитофлуориметрія.

Аналіз рівня індукції апоптозу клітин LL та А-549, проведений методом проточної цитофлуориметрії, наведено на **рис. 1**. Для обох ліній клітин самостійне ЕО без препаратів істотного впливу не чинило. Спостерігалася лише тенденція до збільшення на 2 та 5% апоптотичних клітин обох ліній відповідно. Додавання препаратів до клітин LL ініціювало велику кількість гіподиплоїдних клітин (від 17,9% для ОФ ДР до 24,9% для ПМ ДР). Комбінована дія ЕО і препаратів ще збільшувала кількість апоптотичних клітин LL. Найбільш істотно при спільній дії ЕО з МК — до 29,63%, у той час як в контролі кількість апоптотичних клітин LL не перевищувала 8,88%. Слід зазначити, що для клітин А-549 зміни рівнів індукції апоптозу в подібних експериментах були іншими. Так, мінімальна (9,37%) та максимальна (45,19%) кількість апоптотичних клітин спостерігалася під впливом ПМ ДР та МК відповідно. Під впливом спільної дії ЕО та ПМ ДР кількість апоптотичних клітин збільшувалася до 22,52%.

Таким чином, дія різних факторів впливу ініціювала суттєву різницю в рівнях індукції апоптозу клітин LL та А-549.

Результати процентного розподілу клітин LL та А-549 за фазами клітинного циклу (G0/G1, S та G2/M) представлено на **рис. 2**. Аналіз даних свідчить про наступне. Самостійне ЕО не вносило суттєвих змін у розподіл клітин LL та А-549 за фазами клітинного циклу в порівнянні з контролем. Самостійний вплив препаратів та їх комбінована дія з ЕО суттєво змінювали процентний розподіл клітин у порівнянні з контролем. Кількість клітин LL в фазі G0/G1 збільшувалася у середньому на 40%, у фазі G2/M — на 51%, а в фазі S зменшувалася у середньому на 47% у порівнянні з контролем. В експериментах з клітинами А-549 у фазі G0/G1 їх кількість збільшувалася у середньому на 32%, у фазі G2/M — у 3,5 раза, а в фазі S зменшувалася у середньому в 2,2 раза в порівнянні з контролем.

Отже, під впливом використаних факторів, окрім самостійного впливу ЕО, зафіксовано суттєве зменшення процент-

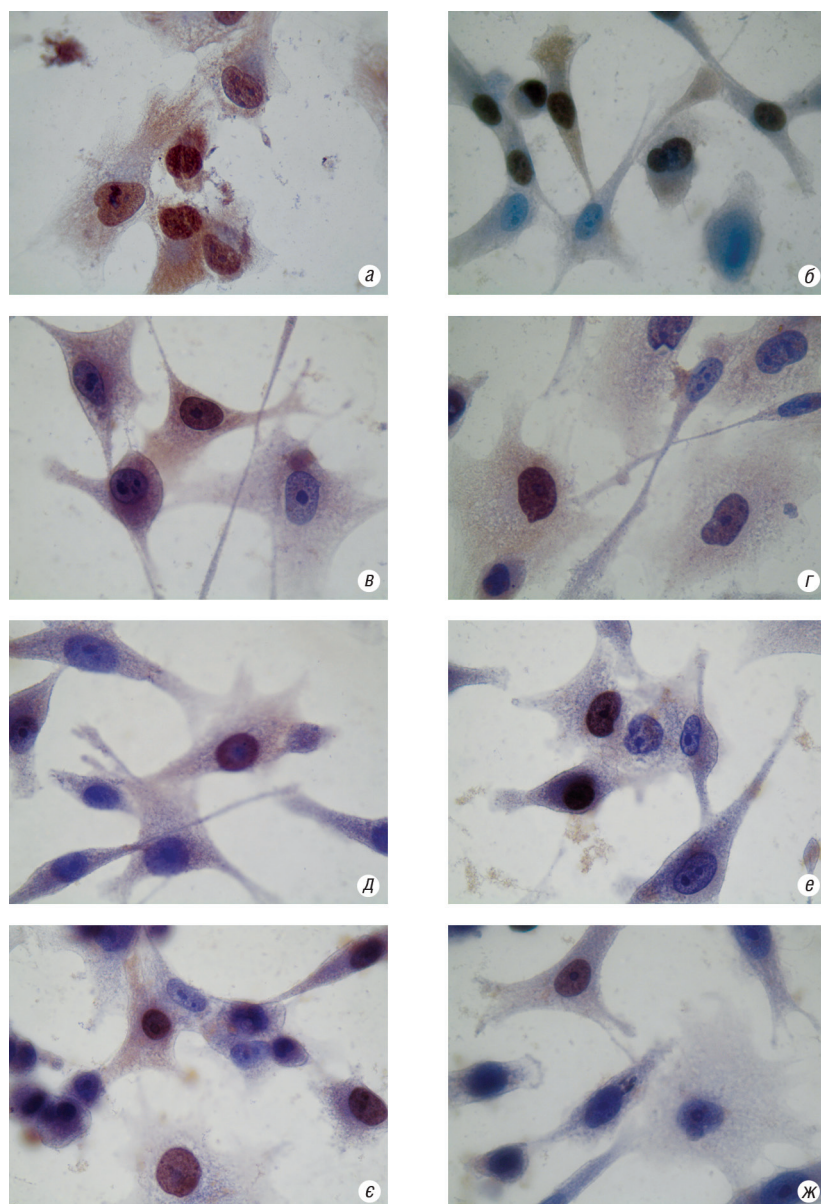


Рис. 3. Експресія топоізомерази II в клітинах А-549: а — контрольні (без впливу); б — А-549+ЕО; в — ОФ ДР+ЕО; г — ПМ ДР; е — ПМ ДР+ЕО; е — МК; ж — МК+ЕО (зб. 1000)

ного розподілу клітин LL та А-549 в S-фазі клітинного циклу. Тобто, уповільнювався синтез ДНК, оскільки основною діючою речовиною у всіх препаратах був ДР.

Імуноцитохімія.

Встановлено, що при опроміненні клітин А-549 відсоток клітин, що експресують топоізомеразу II, знижувався (**рис. 3**). Так, для контрольної групи клітин А-549 він становив $86 \pm 5,7\%$, а для клітин після ЕО — $67,3 \pm 1,8\%$. Відсоток клітин, що експресували топоізомеразу II після обробки їх ОФ ДР, становив $86,3 \pm 2,0$, а після комбінації ОФ ДР з ЕО було виявлено лише $46,3 \pm 8,8\%$ клітин. При обробці клітин ПМ ДР та МК таких суттєвих відмінностей при сумісній дії з ЕО не було виявлено. Кількість клітин, що експресували топоізомеразу II, коливалася в близьких межах: ПМ ДР — $45,3 \pm 2,9\%$,

ПМ ДР+ЕО — $57,3 \pm 4,6\%$, МК — $41 \pm 4\%$, МК+ЕО — $41 \pm 9,0\%$. Це свідчить про безпосередній вплив ПМ ДР та МК на інгібування топоізомерази II.

Таким чином, можна стверджувати про експериментальне підтвердження опосередкованої ролі топоізомерази II в протипухлинних ефектах ДР під впливом ЕО, які були раніше прогнозовані в роботі [11], а також про безпосереднє інгібування ПМ ДР та МК рівня експресії топоізомерази II в пухлинних клітинах А-549.

ВИСНОВКИ

1. ПМ ДР, який був складовою частиною МК, мав більший цитотоксичний ефект, ніж ОФ ДР, а додаткове ЕО ініціювало подальше підвищення загигелі клітин LL. Така ж тенденція спостерігалася і при дослідженні комбінованого впливу

модифікованих препаратів на клітини А-549.

2. Комбінована дія ЕО і МК ініціювала найбільшу кількість апоптотичних клітин LL. Для клітин А-549 найбільший рівень індукції апоптозу спостерігався після використання МК без ЕО.

3. Комбінована дія ЕО з одним із препаратів: ОФ ДР, ПМ ДР або МК — ініціювала суттєве зменшення процентної частини клітин LL та А-549 в S-фазі клітинного циклу.

4. Комбінована дія ЕО з ОФ ДР та обробка клітин ПМ ДР або МК більш ефективно знижували експресію топоізомеразу II в клітинах А-549, ніж ОФ ДР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мовчан Б.А. (2007) Електронно-лучевая нанотехнология и новые материалы в медицине — первые шаги. *Вісн. фармакол. і фармації*, 12: 5–13.
2. Орел В.Е., Шевченко А.Д., Мельник Ю.Г. та ін. (2010) Фізико-хімічні характеристики магніточутливого наноконструкту, отриманого з використанням механомагнетохімічної технології сухого синтезу. *Металлофізика і новітні технології*, 9(32): 1157–1167.
3. Осинский С.П., Ваупель П. (2009) Микрофизология опухолей. Киев: Наук. думка, 254 с.
4. Чехун В.Ф. (2008) Нанотехнології в онкології: від теорії до молекулярної візуалізації та керованої терапії. *Онкологія*, 4(10): 414–419.
5. Apparatus for Short-Wave Inductothermy «Magnetotherm» / V. Orel, N. Nikolov, N. Dzyatkovskaya et al. *Proceedings of NBC 2008*, 294–298, Katushev A.; Dekhtyar Yu. & Spigulis J. (Eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
6. Arruebo M., Fernandez-Pacheco R., Ibarra M.R. (2007) Magnetic nanoparticles for drug delivery. *J. Nanotechnology*, 3(2): 22–32.

7. Hergt R., Dutz S. (2007) Magnetic particle hyperthermia—biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311: 187–192.
8. Mandiraju R.K., Kannapiran P., Kondapi A.K. (2008) Distinct roles of Topoisomerase II isoforms: DNA damage accelerating alpha, double strand break repair promoting beta. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1: 27–34.
9. Nils M., Otto M. (1990) Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Meth.*, 1(130): 149–151.
10. Orel V.E., Kudryavets Y.I., Bezdenzhnyh N.A. (2005) Mechanochemically activated doxorubicin nanoparticles in combination with 40 MHz frequency irradiation on A-549 lung carcinoma cells. *Drug Delivery*, 12: 171–178.
11. Orel V.E., Romanov A.V. (2010) The Effect of Spatially Inhomogeneous Electromagnetic Field and Local Inductive Hyperthermia on Nonlinear Dynamics of the Growth for Transplanted Animal Tumors. *Nonlinear Dynamics*, Book edited by Todd Evans, INTECH, Croatia, 285–308.
12. Rody A., Karn T., Ruckhäberle E. et al. (2008) Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer. *Breast. Cancer Res. Treat.*, 6: 645–653.

Исследование влияния электромагнитного облучения и магниточувствительного наноконструкта на клетки аденокарциномы

В.Э. Орел¹, Н.А. Безденежных², А.Д. Шевченко³, Н.А. Николов¹, А.В. Романов¹, Н.Н. Храновская¹, О.В. Скачкова¹, Ю.И. Кудрявец², И.Б. Щепотин¹

¹Национальный институт рака МЗ Украины, Киев

²Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

³Институт металлофизики им. Г.В. Курдюмова НАН Украины, Киев

Резюме. Проведено експериментальне дослідження можливості збільшення ефективності протипухлинного дії магніточувствительного наноконструкта на основі наночастинки оксида заліза і доксорубіцину при електромагнітному облученні кліток аденокарциноми. Використовували клітки мишей лінії LL і клітки людини А-549. В роботі досліджували вплив магніточувствительного наноконструкта на основі наночастинки Fe₃O₄ з КСІ і доксорубіцину при електромагнітному облученні з частотою 40 МГц. Підрахунок живих і померлих кліток здійснювали з допомогою камери Горяєва. Для аналізу індукції апоптозу і розподілу пухлинних кліток по фазах клітинного циклу проводили проточну цитофлуориметрію. Також з допомогою імуноцитохімічного методу досліджували експресію топоізомеразу II. Парамагнітний доксорубіцин, який входив до складу частини в магніточувствительний наноконструкт, мав більший цитотоксичний ефект, ніж офіційний доксорубіцин, а додаткове електромагнітне облучення ініціювало наступне підвищення смертності кліток LL і А-549. Комбіноване діє електромагнітного облучення і магніточувствительного наноконструкта найбільш суттєво підвищувало кількість апоптотических кліток LL. Для кліток А-549 найбільший рівень індукції апоптозу спостерігався після використання магніточувствительного наноконструкта без електромагнітного облучення. Комбіноване діє електромагнітного облучення з одним із препаратів: офіційним доксорубіцином, парамагнітним доксорубіцином або магніточувствительним наноконструктом — ініціювало суттєве зменшення процентного розподілу кліток LL і А-549 в S-фазі клітинного циклу. Обробка кліток парамагнітними доксорубіцином або магніточувствительним наноконструктом більш ефективно знижували експресію топоізомеразу II в клітках А-549, ніж офіційний доксорубіцин.

Ключевые слова: клітки аденокарциноми, магніточувствительний наноконструкт, парамагнітний доксорубіцин, електромагнітне облучення.

The effect of electromagnetic irradiation and magnetosensitive nanocomplex on adenocarcinoma cells

V.E. Orel¹, N.O. Bezdenzhnykh², A.D. Shevchenko³, M.O. Nikolov¹, A.V. Romanov¹, N.M. Khranovska¹, O.V. Skachkova¹, Yu.I. Kudryavets², I.B. Schepotin¹

¹National Cancer Institute of Ministry of Health of Ukraine, Kyiv

²R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

³G.V. Kurdyumov Institute for Metal Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Summary. The antitumor effect of magnetosensitive nanocomplex of iron oxide nanoparticles and doxorubicin with electromagnetic irradiation on adenocarcinoma cells was studied. The mice cells of the LL line and human cells A-549 were used. The influence of magnetosensitive nanocomplex of Fe₃O₄ nanoparticles with KCl, doxorubicin and electromagnetic irradiation with the frequency of 40 MHz was investigated. Living and dead cells were counted with a Goryayev's chamber. The apoptosis and distribution of tumor cells by cell cycle phases analyzed through flow cytometry. The expression of topoisomerase II was investigated by the method of immunocytochemistry. Paramagnetic doxorubicin, which was in magnetosensitive nanocomplex, had greater cytotoxic effect than conventional doxorubicin, additional electromagnetic irradiation initiated the increase in cell death LL and A-549. Combined effect of electromagnetic irradiation and magnetosensitive nanocomplex most significantly increased number of apoptotic LL cells. In the case of A-549 cells maximum changes in apoptosis levels were after treatment by magnetosensitive nanocomplex without electromagnetic irradiation. Combined effect of electromagnetic irradiation with conventional doxorubicin, paramagnetic doxorubicin or magnetosensitive nanocomplex decreased percentage composition in S-phase of the cell cycle for LL. Treatment of A-549 cells by paramagnetic doxorubicin or magnetosensitive nanocomplex more effectively reduced the expression of topoisomerase II in cells A-549 than of official doxorubicin.

Key words: adenocarcinoma cells, magnetosensitive nanocomplex, paramagnetic doxorubicin, electromagnetic irradiation.