

<sup>1</sup>Національний інститут раку, Київ

<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

# ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ПРОТИПУХЛИННОГО ЕФЕКТУ ТЕХНОЛОГІЇ МАГНІТНОЇ НАНОТЕРАПІЇ НА МОДЕЛІ КУЛЬТУР КЛІТИН ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ЛЮДИНИ РІЗНОГО ТКАНИННОГО ГЕНЕЗУ



В.Е. Орел<sup>1</sup>, Н.О. Безденежних<sup>2</sup>,  
О.О. Лихова<sup>2</sup>, М.О. Ніколов<sup>1</sup>,  
І.В. Орел<sup>1</sup>, А.В. Романов<sup>1</sup>,  
Ю.Й. Кудрявець<sup>2</sup>, І.Б. Щепотін<sup>1</sup>

Адреса:

Орел Валерій Еммануїлович  
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43  
Національний інститут раку МОЗ України  
Тел.: (044) 257-60-68  
E-mail: v-orel@i.com.ua

**Ключові слова:** культури клітин злоякісних пухлин, магнітна нанотерапія, магніточутливий наноконструкт, доксорубіцин.

Досліджено вплив доксорубіцину (ДР), магніточутливого наноконструкту (МНК) з наночастинок  $Fe_3O_4$  і ДР, електромагнітного опромінення (ЕО) та постійного магнітного поля (ПМП) на клітини злоякісних пухлин ліній А-549, Т-47D і HeLa S3. ЕО та ПМП найефективніше посилювали цитотоксичну дію ДР та МНК на клітини лінії А-549. Кількість позитивних клітин з ядерною локалізацією топоізомери ІІа після дії магнітохімічних факторів різнилася залежно від тканинного генезу. У клітинах лінії Т-47D вплив магнітохімічних чинників ініціював зменшення кількості p21WAF1-позитивних клітин з ядерною локалізацією цього білка. Виявлено зменшення кількості  $\beta$ -катенінпозитивних клітин HeLa S3 внаслідок дії ДР, МНК, ЕО та ПМП.

## ВСТУП

Використання нанотерапії в комбінації зі змінними магнітними полями, що ініціюють гіпертермію, вважається перспективним підходом до лікування хворих зі злоякісними пухлинами [1]. Найчастіше магнітну нанотерапію застосовують у комбінації з хіміо-, радіотерапією, гіпертермією та хірургією. Протипухлинний ефект, зумовлений дією індукційної гіпертермії, викликає незворотні пошкодження клітинного дихання, зміни в процесах синтезу нуклеїнових кислот і білків, у тому числі зниження активності ферментів та підвищення у клітинах пористості мембран. Це ініціює збільшення транспорту хімотерапевтичних препаратів у клітині [2]. Більшість солідних пухлин містять атипові мережі кровоносних судин, які не здатні суттєво збільшити кровотік у відповідь на тепловий стрес, тому в таких пухлин існує вища імовірність нагріву до температур понад 42 °С. Пілотні клінічні дослідження засвідчили перспективу лікування хворих онкологічного профілю з використанням технології магнітної нанотерапії, але цей метод ще не може бути широко впроваджений у медичну практику внаслідок низки проблем, які наведено нижче [3].

Локалізована глибока гіпертермія вже при вихідних потужностях 500–1000 Вт призводить до процесу актив-

ного потовиділення, гіперемії шкіри, збільшення кількості дихальних циклів на 2–12 за хвилину, підвищення артеріального тиску на 20–40 мм рт.ст. та частоти пульсу на 20–60 уд./хв. Проведені дослідження показали, що ефект індукційної гіпертермії можливий при пухлинах, розмір яких не перевищує 5 см; лише 62% пухлин розміром >5 см можуть бути ефективно нагріті до температури >42 °С [4].

Альтернативним підходом до вирішення вищенаведених проблемних питань може бути розробка протипухлинної технології магнітної нанотерапії в умовах помірної індукційної магнітотермії при температурі до 39 °С. Вона базується на відомих магнітно-спінових ефектах впливу на кінетику вільнорадикальних реакцій. В основі фізико-хімічного механізму дії технології магнітної нанотерапії мають бути покладені ефекти впливу слабких магнітних полів (постійних і змінних, зовнішніх і внутрішніх, зумовлених магнітним моментом ядер) на швидкість процесів взаємодії парамагнітних частинок (радикалів, електронів, іонів, дірок, солітонів і триплетних молекул), а також на хімічні реакції з їх участю. В основі цих ефектів лежить принцип спінової селекції — реакції можливі лише для визначених спінових станів реагентів. Наприклад, при зустрічі двох радикалів утворюється радикальна пара в синглетному або триплет-

ному стані, але рекомбінація цих радикалів у молекулу відбувається лише із синглетної пари. Реакція в триплетній парі заборонена згідно з принципом Паулі. Магнітні взаємодії спінів із зовнішніми та внутрішніми ядерними полями дуже слабкі за енергією, але суттєво впливають на хімічні реакції, змінюючи спін реагуючих частинок, знімаючи спінові заборони. Магнітохімічні ефекти, що мають кінетичне походження, призводять до підвищення концентрації вільних радикалів [5]. Вони можуть бути актуальні в контексті підвищення протипухлинного ефекту антрациклінового антибіотика доксорубіцину (ДР) при використанні технології магнітної нанотерапії.

Оцінка протипухлинного ефекту в сучасній експериментальній онкології не може бути зведена лише до формального вивчення життєздатності злякисних клітин. Потрібне розуміння впливу досліджуваних факторів принаймні на окремі ланки внутрішньо- та зовнішньоклітинних стохастичних ефектів сигналізації на основі вивчення їх імунофенотипічного профілю. Зокрема, надзвичайно цікавим є дослідження білка  $\beta$ -катеніну, пов'язаного з клітинною адгезією через систему кадгеринів, поява якого в ядрі свідчить про набуття клітинами здатності до інвазії та міграції. Також у роботі приділено увагу білку p21WAF1, який при ядерній локалізації виконує супресорну функцію, що викликає блокування розмноження злякисно-трансформованих клітин, а при локалізації в цитоплазмі — інгібує утворення стрес-фібрил фокальних контактів і підвищує міграцію клітин та виконує антиапоптозичні функції шляхом пригнічення проапоптозичних кіназ ASK1, JNK, p38 та інгібіції прокаспаз-3 [6]. Досліджено також білок, асоційований з лікарською стійкістю клітин, — топоімеразу II альфа (Топо II  $\alpha$ ), що при цитоплазматичній локалізації, за існуючими даними, сприяє набуттю клітинами резистентності до деяких протипухлинних препаратів [7, 8].

Метою даної роботи було дослідження комбінованого впливу ДР та електромагнітного і постійного магнітного поля (ПМП) на життєздатність та фенотипічний профіль клітин низки культур зі злякисних пухлин людини.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Культури клітин.** У роботі використовували такі клітинні лінії людини: недрібноклітинного раку легені (лінія А-549), раку грудної залози (Т-47D), раку шийки матки (лінія HeLa, клон S3). Усі лінії отримано з Клітинного банку ліній з тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Для дослідження використовували нижчеперелічені реактиви, прилади та засоби: середовище RPMI-1640 та/або DMEM (РАА, Австрія) з 2 ммоль/л L-глутаміну та 40 мкг/мл ген-

таміцину, ембріональну сироватку теляти та сироватку новонароджених телят (РАА, Австрія); розчини: фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), 0,02% розчин Na-EDTA (розчин версену) (БіоТестМед, Україна), 0,25% розчин трипсину (Sigma, США); барвники: трипановий синій (Sigma, США), 0,4% розчин. Прилади та матеріали: стерильний посуд, гемоцитометр, CO<sub>2</sub>, інкубатор, ламінарний бокс, світлові мікроскопи (Erga inc., Аксиоверт 25С, Carl Zeiss, Німеччина), опромінювач, мультислунковий спектрофотометр (Labsystems Multiskan PLUS, Фінляндія).

**Культивування клітин.** Клітини культивували *in vitro* в повному поживному середовищі RPMI-1640 або DMEM з 10% сироватки ембріонів або новонароджених телят (залежно від досліджуваних клітин), 40 мкг/мл гентаміцину у зволоженій атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С. Зміну середовища проводили кожні 2–3 доби. Після того, як клітини утворювали на субстраті щільний моношар (3–4-та доба росту), здійснювали їх пересів за допомогою фосфатно-сольового буфера, що мистив 1 мМ EDTA і 0,05% трипсину Dіfco.

**Магніточутливий нанокмплекс (МНК).** Як самостійні частини або складові препаратів було використано наночастинки оксиду заліза Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> діаметром <50 нм (Sigma) й ДР виробництва Пфайзер Італія С.р.л., Італія. МНК отримували за допомогою технології механомагнітохімічного синтезу [9]. Згідно з експериментально отриманим показником IC<sub>50</sub>, препарати застосовували в дозах 0,2 мкг/мл. Масова концентрація ДР у МНК — 67%.

**Електромагнітне опромінення (ЕО).** Для просторово-неоднорідного ЕО культур клітин використовували прототип апарата «Магнітерм» (Радмір, Україна) з магнітодипольним аплікатором без постійного магніта. Параметри ЕО: частота — 40 МГц, вихідна потужність — 60 Вт. Для комбінованого опромінення ПМП та ЕО використовували магнітно-дипольний аплікатор с постійним магнітом 0,38 Тл [9].

**Цитотоксичність.** Для визначення ефекту комбінованої дії опромінення та досліджуваних хіміопрепаратів клітини вирощували в чашках діаметром 40 мм (2 • 10<sup>5</sup> клітин на чашку) за стандартних умов (у повному поживному середовищі RPMI-1640 або DMEM з 10% сироватки ембріонів або новонароджених телят, 40 мкг/мл гентаміцину у зволоженій атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С) протягом 24–48 год. Через 60 хв після внесення досліджуваних хіміопрепаратів до чашки їх опромінювали протягом 30 хв. Підрахунок клітин проводили через 48 год після внесення препарату та опромінення клітин.

Визначення кількості живих і мертвих клітин здійснювали за допомогою гемоцитометра після фарбування їх вітальним барвником — трипановим синім, використовуючи формулу [10]:

$$A/80 \cdot 2 = X \cdot 10^6 \text{ клітин в } 1 \text{ мл середовища, (1)}$$

де А — кількість клітин у камері Горяєва (в 5 великих квадратах), •2 — розведення з трипановим синім (1:1).

**Імуноцитохімічний аналіз.** При проведенні імуноцитохімічного аналізу цитоспінові препарати досліджуваних клітин фіксували в розчині (метанол + ацетон: 1:1) протягом 2 год за температури –20 °С, інкубували з 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну протягом 20 хв. Потім наносили моноклональні антитіла (p21WAF1 (NeoMarkers),  $\beta$ -catenin (Dako), Topoisomerase II alpha (ThermoScientific)) на 60 хв, після чого застосовували систему візуалізації Poly Vue (ThermoScientific, ОПТЕК), кон'юговану з пероксидазою, та виявляли активність ферменту із застосуванням як субстрату діамінобензидину (ThermoScientific, ОПТЕК). Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали водою та дофарбовували гематоксиліном та еозином (за Майєром, Sigma) (15–30 с). Аналіз результатів проводили, визначивши кількість позитивних (+) клітин за допомогою мікроскопа AxioStarPlus (Carl Zeiss, Німеччина) при збільшенні у 320 разів, та оцінювали за допомогою класичного методу H-Score:

$$S = 1 \cdot A + 2 \cdot B + 3 \cdot C, (2)$$

де S — показник H-Score, значення якого знаходяться у межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100% клітин); А — відсоток слабо «забарвлених» клітин, В — відсоток помірно «забарвлених» клітин, С — відсоток сильно «забарвлених» клітин.

**Статистика.** 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.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Цитотоксичність.** На першому етапі було проведено дослідження впливу ДР, МНК, ЕО і ПМП на життєздатність клітин раку грудної залози, недрібноклітинного раку легені та карциноми шийки матки людини (табл. 1). Виявлено, що ЕО, а також поєднана дія ЕО та ПМП підсилювали ефект протипухлинного впливу як ДР, так і МНК. При цьому порівняно з самостійним використанням ДР підвищення ефекту протипухлинної дії становило в середньому 24%. Встановлено, що найбільш ефективно вся комбінація використаних чинників діяла на клітини лінії А-549 недрібноклітинного раку легені людини (3-тя, 6-та групи): протипухлинний ефект зростав на 38% при зіставленні з впливом ДР.

**Імуноцитохімічний аналіз.** Наступним етапом експерименту було досліджен-

**Таблиця 1.** Вплив МНК, ЕО і ПМП на життєздатність пухлинних клітин різного тканинного генезу

№ з/п	Варіант впливу	Клітинні лінії		
		T-47 D	A-549	HeLa S3
живі клітини (відсоток від контролю)				
1	ДР	46±2,2*	42±3,2*	54±1,8*
2	ДР + ЕО	38±1,9* <sup>+</sup>	35±2,4*	29±2,0* <sup>+</sup>
3	ДР + ЕО + ПМП	41±0,8* <sup>+</sup>	26±3,0* <sup>+</sup>	47±3,8*
4	МНК	43±3,0*	35±3,6*	38±0,4* <sup>+</sup>
5	МНК + ЕО	39±2,0* <sup>+</sup>	31±1,8* <sup>+</sup>	37±2,6* <sup>+</sup>
6	МНК + ЕО + ПМП	41±0,5* <sup>+</sup>	28±1,2* <sup>+</sup>	32±0,2* <sup>+</sup>

\*Статистично значущі відмінності порівняно з контролем з рівнем значущості  $p < 0,05$ ; <sup>+</sup>статистично значущі відмінності порівняно з ДР з рівнем значущості  $p < 0,05$ .

ня на клітинному рівні впливу МНК, ЕО і ПМП на фенотипічний профіль клітин раку грудної залози, легені та шийки матки людини (табл. 2–4).

**Топо II α.** Виявлено, що після дії ДР і МНК при ЕО зменшується кількість Топо II α-позитивних клітин з локалізацією в цитоплазмі клітин А-549 в середньому на 53% відносно контролю. Обсяг Топо II α-позитивних клітин відносно контролю в тих самих клітинах з ядерною локалізацією зменшувався на 35% лише після комплексної дії МНК, ЕО та ПМП. При дослідженні клітин лінії Т-47D зареєстровано суттєве зниження рівня антигену в ядрах після комплексного впливу ДР, ЕО та ПМП до значення  $1,9 \pm 0,5$ . У цитоплазмі клітин HeLa S3 зменшувалася кількість Топо II α-позитивних клітин максимально на 92% відносно контролю при комплексній дії МНК, ЕО та ПМП. Зміни в кількості Топо II α-позитивних клітин з ядерною локалізацією були найсуттєвішими в клітинах HeLa S3, при цьому відзначали суттєве збільшення (в середньому майже вдвічі відносно контролю) кількості позитивних клітин після дії всіх протипухлинних агентів. Отримані факти свідчать про відмінності впливу протипухлинних чинників залежно від генезу клітин, що потребує більш детального дослідження на клітинно-молекулярному рівні систем, що пов'язані з репарацією та лікарською стійкістю пухлинних клітин до протипухлинних агентів.

**Блок p21WAF1.** При дослідженні цього білка — регулятора клітинного циклу — найсуттєвішою відмінністю між різними варіантами впливу та типами клітин була поява невеликої кількості p21WAF1-позитивних клітин із локалізацією антигену в цитоплазмі клітини після будь-якої зовнішньої дії протипухлинних агентів на клітини А-549 та Т-47D, окрім 6-ї групи. При використанні МНК та ПМП з ЕО кількість клітин Т-47D з експресією цього антигену в цитоплазмі зменшувалася на 88% більше, ніж після дії ДР та ПМП з ЕО. При впливі усіх досліджуваних чинників кількість p21WAF1-позитивних клітин з ядерною локалізацією в лінії Т-47D зменшувалася в середньому на 45%. Це свідчить про зниження функціонування за таких умов цього білка як супресора. Словом клітин HeLa S3, то в цитоплазмі динаміка зміни кількості p21WAF1-позитивних клітин мала коливальний характер при по-

слідовності дії чинників ДР → ДР + ЕО → ДР + ЕО + ПМП або МНК → МНК + ЕО → МНК + ЕО + ПМП з максимумом після ЕО. В ядрі антиген знижувався в 2–4-й групах із використанням ДР та в 5-й групі при самостійному впливі МНК — у середньому на 62% ( $p < 0,05$ ).

**Блок β-катенін.** У клітинах лінії А-549 у досліді ДР виявлено збільшення кількості β-катенінпозитивних клітин (з локалізацією білка в цитоплазмі) під впливом ЕО або ЕО + ПМП

з  $29,9 \pm 8,6$  до  $44,0 \pm 10,8$  та  $95,0 \pm 18,6$  відповідно ( $p < 0,05$ ), у той час як у досліді із МНК вплив ЕО або комбінація ЕО + ПМП, навпаки, зменшували їх кількість до  $31,0 \pm 7,1$  ( $p < 0,05$ ). При використанні МНК тенденція до зниження експресії білка в ядрі відносно самостійного впливу препарату, як і в цитоплазмі під впливом зовнішніх чинників, збереглася. Виявлено, що після дії ДР, МНК та при поєднаному впливі з ЕО відзначають суттєве збільшення кількості β-катенінпозитивних клітин Т-47D (з локалізацією білка в цитоплазмі), при цьому додатковий вплив ПМП значно знижував експресію цього білка (4-та, 7-ма групи). При дослідженні клітин іншого генезу (HeLa S3) виявлено тенденцію до зменшення кількості позитивних клітин і з ядерною, і з цитоплазматичною локалізацією β-катеніну при будь-яких комплексах використаних протипухлинних чинників. Особливо значим було зменшення кількості β-катенінпозитивних

**Таблиця 2.** Вплив МНК, ЕО та ПМП на імунофенотипічний профіль клітин недрібноклітинного раку легені людини (лінія А-549)

№ з/п	Варіант впливу	Антиген/внутрішньоклітинна локалізація					
		Торо II α		p21WAF1		β-катенін	
		ЦП†	Ядерна	ЦП	Ядерна	ЦП	Ядерна
1	Контроль (без впливу)	25,8±3,4	97,4±7,07	0	0	62,4±12,8	64,9±16,2
2	ДР	30,8±3,1	89,0±12,7	57,0±8,6*	0	29,9±8,6*	89,9±12,5
3	ДР + ЕО	7,8±0,9* <sup>+</sup>	103,9±17,3	46,5±12,8*	0	44,0±10,8	52,0±10,0*
4	ДР + ЕО + ПМП	10,0±3,7* <sup>+</sup>	108,9±13,6	25,6±12,8	0	95,0±18,6*	134,0±11,4* <sup>+</sup>
5	МНК	14,1±3,4* <sup>+</sup>	107,4±0,5	67,5±7,5*	0	83,3±16,7*	103,2±29,5
6	МНК + ЕО	16,6±0,5* <sup>+</sup>	91,6±21,7	48,0±8,5*	0	33,8±7,2	70,8±15,3
7	МНК + ЕО + ПМП	27,1±4,2	63,5±14,1*	54,0±5,77*	0	31,0±7,1*	67,0±17,8

ЦП† — локалізація антигену в цитоплазмі клітини; \*статистично значущі відмінності порівняно з контролем з рівнем значущості  $p < 0,05$ ; <sup>+</sup>статистично значущі відмінності порівняно з ДР з рівнем значущості  $p < 0,05$ .

**Таблиця 3.** Вплив МНК, ЕО та ПМП на імунофенотипічний профіль клітин раку грудної залози людини (лінія Т-47D)

№ з/п	Варіант впливу	Антиген/внутрішньоклітинна локалізація					
		Торо II α		p21WAF1		β-катенін	
		ЦП†	Ядерна	ЦП	Ядерна	ЦП	Ядерна
1	Контроль (без впливу)	0	99,8±24,8	0	133,0±28,1	17,0±4,8	62,0±5,0
2	ДР	20,0±5,1*	72,5±25,1	66,5±11,6*	114,1±15,7	120,0±30,2*	99,0±27,0
3	ДР + ЕО	0	30,0±11,4*	22,0±8,6* <sup>+</sup>	84,0±19,5	129,0±37,8*	140,0±29,7*
4	ДР + ЕО + ПМП	0	1,9±0,5* <sup>+</sup>	70,0±15,7*	125,0±13,2	17,0±5,0*	70,0±14,5
5	МНК	0	93,5±19,8	27,0±9,4* <sup>+</sup>	46,0±13,9* <sup>+</sup>	83,0±13,2*	134,0±22,8*
6	МНК + ЕО	0	85,0±7,6	0	28,0±8,5* <sup>+</sup>	65,0±11,4*	91,0±26,3
7	МНК + ЕО + ПМП	0	79,5±23,5	12,0±3,5* <sup>+</sup>	44,0±13,0* <sup>+</sup>	2,5±2,5* <sup>+</sup>	55,0±5,7

ЦП† — локалізація антигену в цитоплазмі клітини; \*статистично значущі відмінності порівняно з контролем з рівнем значущості  $p < 0,05$ ; <sup>+</sup>статистично значущі відмінності порівняно з ДР з рівнем значущості  $p < 0,05$ .

**Таблиця 4.** Вплив МНК, ЕО та ПМП на імунофенотипічний профіль клітин раку шийки матки людини (лінія HeLa S3)

№ з/п	Варіант впливу	Антиген/внутрішньоклітинна локалізація					
		Торо II α		p21WAF1		β-катенін	
		ЦП†	Ядерна	ЦП	Ядерна	ЦП	Ядерна
1	Контроль (без впливу)	43,5±5,0	50,4±11,0	26,6±2,1	67,5±9,7	79,1±7,3	94,9±15,4
2	ДР	17,0±1,5*	84,8±14,4	32,4±5,6	22,2±2,0* <sup>+</sup>	34,0±6,1*	58,0±9,0
3	ДР + ЕО	45,8±3,5*	108,1±26,7	42,3±8,7	51,4±7,8*	51,2±8,2*	39,1±7,0*
4	ДР + ЕО + ПМП	85,0±7,8* <sup>+</sup>	84,9±14,4	5,8±1,7* <sup>+</sup>	14,1±3,0* <sup>+</sup>	3,3±0,5* <sup>+</sup>	37,4±10,9*
5	МНК	69,6±28,8*	142,3±25,6* <sup>+</sup>	1,7±0,8* <sup>+</sup>	15,3±4,1*	14,1±4,9* <sup>+</sup>	41,6±16,3*
6	МНК + ЕО	4,6±1,9* <sup>+</sup>	133,1±14,36* <sup>+</sup>	87,3±12,7* <sup>+</sup>	76,6±21,4*	61,6±20,5	59,1±12,2
7	МНК + ЕО + ПМП	3,3±1,1* <sup>+</sup>	102,3±7,21*	33,7±7,5	79,0±18,9*	17,4±5,4*	44,1±14,9*

ЦП† — локалізація антигену в цитоплазмі клітини; \*статистично значущі відмінності порівняно з контролем з рівнем значущості  $p < 0,05$ ; <sup>+</sup>статистично значущі відмінності порівняно з ДР з рівнем значущості  $p < 0,05$ .



клітин HeLa S3 при комбінованій дії ЕО + ПМП (4-та, 7-ма групи).

Для детальнішого розуміння особливостей впливу ЕО і ПМП на пухлинні клітини необхідне додаткове вивчення експресії β-катеніну в комплексі з іншим білком адгезії — Е-кадгеріном, оскільки відомо, що у разі пригнічення експресії Е-кадгерину β-катенін у незв'язаному з Е-кадгеріном стані є нестабільним, внаслідок чого вільного β-катеніну стає настільки багато, що системи його деградації не виконують своєї функції та частина β-катеніну релокалізується в ядро, де він проявляє свою транскрипційну активність [11].

Таким чином, отримані дані з використанням технології магнітної нанотерапії свідчать про відмінності у впливі досліджених магнітохімічних чинників залежно від типу клітин, оскільки вони по-різному викликають релокалізацію певних антигенів. Імовірно, це сприяє зміні функціонування останніх. Ці факти у фундаментальному аспекті свідчать про вплив магнітохімічних факторів на стохастичні процеси клітинної сигналізації пухлинних клітин та потребують кінетичного дослідження фенотипу пухлинних клітин для вірогідного прогнозування подальшої їх поведінки — інгібіції чи стимуляції проявів злоякісного фенотипу за характеристикою їх інвазійних/міграційних властивостей та стану білків, що асоційовані з лікарською стійкістю. У прагматичному аспекті отримані результати засвідчили перспективність подальшого проведення доклінічних до-

сліджень технології магнітної нанотерапії в дослідках з експериментальними злоякісними пухлинами тварин.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що ЕО та ПМП посилюють дію ДР на пухлинні клітини при їх комбінованому застосуванні, знижуючи їх виживаність. Найбільш ефективно ці протипухлинні чинники впливають на клітини недрібноклітинного раку легені людини (лінія А-549) і в експериментах із МНК.

2. Встановлено, що при дії на пухлинні клітини магнітохімічних факторів відбувається зміна кількості Торо II α-позитивних клітин з ядерною локалізацією антигену. Кількість позитивних клітин суттєво різнилася залежно від тканинного генезу: значне зменшення кількості Торо II α-позитивних-клітин відзначали серед клітин раку грудної залози Т-47D, хоча серед пухлинних клітин шийки матки HeLa S3 відмічено суттєве збільшення кількості Торо II α-позитивних-клітин, а в клітинах лінії раку легені людини А-549 зміни в експресії цього антигену не виявлено, за винятком їх зниження в досліді з використанням МНК і поєднаного впливу ЕО та ПМП.

3. Дослідження р21WAF1-позитивних клітин Т-47D з ядерною локалізацією білка засвідчило, що всі магнітохімічні чинники ініціювали зменшення кількості позитивних клітин, а в подібних експериментах із клітинами лінії HeLa S3 досліджувані зміни мали кількісний характер.

4. Встановлено зменшення кількості β-катенінпозитивних клітин HeLa S3 внаслідок дії ДР, МНК і впливу ПМП та ЕО. У клітинах іншого генезу відзначали релокалізацію цього антигену, а кількість позитивних клітин зменшувалася або зростала залежно від дії певних комплексів протипухлинних чинників.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Налескіна Л.А., Бородай Н.В., Чехун В.Ф. (2009) Сьогодення та перспективи створення наносистем спрямованої доставки лікарських препаратів до пухлинних клітин. Онкологія, 11(3): 166–173.
2. Наноматеріали і нанокompозити в медицині, біології, екології (2011) Под ред. А.П. Шпака, В.Ф. Чехуна. Київ: Наукова думка, 444 с.
3. Campbell R.B. (2007) Battling tumors with magnetic nanotherapeutics and hyperthermia. Nanomedicine, 2(5): 649–652.
4. Storm F.K., Elliott R.S., Harrison W.H. et al. (1982) Hyperthermia by magnetic-loop induction: a new approach to human cancer therapy. Microwave theory and techniques, IEEE, 30(8): 1149–1158.
5. Cohen A.E. (2009) Nanomagnetic control of intersystem crossing. J. Phys. Chem.; 113: 11084–11092.
6. Романов В.С. (2011) Регулятор клеточного цикла p21Waf1: роль в онкоген-индуцированной трансформации и клеточном старении. Автореферат на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. 26 с.
7. Liu D., Huang C., Kameyama K. et al. (2002) Topoisomerase IIα expression is regulated by the p53 tumor suppressor gene in nonsmall cell lung carcinoma patients. Cancer, 94(8): 2239–2247.
8. Chen M.C., Chen C.H., Chuang H.C. et al. (2011) Novel mechanism by which histone deacetylase inhibitors facilitate topoisomerase IIα degradation in hepatocellular carcinoma cells. Hepatology, 53(1): 148–159.
9. Орел В., Дзятковская Н., Романов А. (2013) Магнитная нанотерапия рака. LAP Lambert Academic Publishing, 224 с.
10. Орел В.Е., Безденежных Н.О., Шевченко А.Д. та ін. (2011) Дослідження впливу електромагнітного опромінення та магніточутливого нанокompлексу на клітини аденокарциноми. Клин. онкол., 4(4): 148–152.
11. Копнин Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены. Источник: RosOncoWeb.Ru.

## Исследование механизмов противоопухолевого эффекта технологии магнитной нанотерапии на модели культур клеток злокачественных опухолей человека различного тканевого генеза

В.Э. Орел<sup>1</sup>, Н.А. Безденежных<sup>2</sup>, А.А. Лихова<sup>2</sup>,  
Н.А. Николов<sup>1</sup>, И.В. Орел<sup>1</sup>, А.В. Романов<sup>1</sup>, Ю.И. Кудрявец<sup>2</sup>,  
И.Б. Шепотин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный институт рака, Киев

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

**Резюме.** Исследовано влияние доксорубина (DR), магниточувствительного нанокompлекса (МНК) из наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и ДР, электромагнитного облучения (ЭО) и постоянного магнитного поля (ПМП) на злокачественные клетки линии А-549, Т-47D и HeLa S3. ЭО и ПМП наиболее эффективно усиливали цитотоксический эффект действия ДР и МНК в клетках линии А-549. Количество положительных клеток с ядерной локализацией топоизомеразы IIα после действия магнитохимических факторов отличалось в зависимости от генеза исследуемых клеток. В клетках линии Т-47D влияние магнитохимических факторов инициировало уменьшение количества р21WAF1-положительных клеток с ядерной локализацией этого белка. Установлено уменьшение количества β-катениноположительных клеток HeLa S3 после воздействия ДР, МНК, ЭО и ПМП.

**Ключевые слова:** культуры клеток злокачественных опухолей, магнитная нанотерапия, магниточувствительный нанокompлекс, доксорубин.

## Investigation of mechanisms of antitumor effect magnetic technology nanotherapy on model cultures of human malignant cells in various tissue genesis

V.E. Orel<sup>1</sup>, N.O. Bezdenezhnykh<sup>2</sup>, O.O. Lyhova<sup>2</sup>, N.O. Nikolov<sup>1</sup>,  
I.V. Orel<sup>1</sup>, A.V. Romanov<sup>1</sup>, Y.I. Kudryavets<sup>2</sup>, I.B. Shepotin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Cancer Institute, Kyiv

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

**Summary.** We studied an effect of the doxorubicin (DR), magnetosensitive nanocomplex (MNC) from Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with DR, electromagnetic irradiation (EI) and constant magnetic field (CMF) on malignant cell line А-549, Т-47D and HeLa S3. EI and CMF most effectively increased the cytotoxic effect of DR and MNC in the cell line А-549. Number of Topo IIα-positive cells with nuclear localization of antigen after exposure to magnetochemical factors differed depending on the tumor cells of various genesis. Magnetochemical factors initiated the reduction of positive cells in p21WAF1-protein with nuclear localization in Т-47D cell line. The decrease of β-catenin-positive HeLa S3 cells after exposure DR, MNCs, EI and CMF was observed.

**Key words:** malignant cells cultures, magnetic nanotherapy, magnetosensitive nanocomplex, doxorubicin.