

¹Національний інститут раку, Київ

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

ПРОТИПУХЛИННИЙ ЕФЕКТ ТА РОЗПОДІЛ ЗАЛІЗА У ПУХЛИНІ ТА СИРОВАТЦІ КРОВІ ПРИ МАГНІТНІЙ НАНОТЕРАПІЇ КАРЦИНОСАРКОМИ УОКЕР-256



74

В.Е. Орел¹, В.О. Мельник¹,
А.В. Романов¹, О.Ю. Рихальський¹,
А.П. Бурлака², С.М. Лукін²,
І.Б. Щепотін¹

Адреса:

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

Ключові слова: карциносаркома Уокер-256, магнітна нанотерапія, магніточутливий наноконструкт, залізо, трансферин, доксорубіцин.

Магнітна нанотерапія з використанням магніточутливого наноконструкту (МНК), до складу якого входили наночастинки Fe_3O_4 та доксорубіцин із площею петлі гістерезису 1135,4 ерг/г, ініціює більший коефіцієнт гальмування росту карциносаркоми Уокер-256 (на 23%), ніж при використанні МНК із меншою площею петлі гістерезису 136,3 ерг/г. Вміст комплексів вільного заліза був мінімальним у карциносаркомі Уокер-256 після магнітної нанотерапії з МНК, який мав більшу площу петлі гістерезису, а максимальний рівень вільного заліза виявляли у тварин після впливу офіційного доксорубіцину. Концентрація іонів заліза в сироватці крові зростала в середньому в 2,2 рази в усіх досліджених групах, незалежно від особливостей проведеної терапії відносно показників як для тварин контрольної групи, так і тварин без пухлин. Концентрація сечової кислоти, аланінамінотрансферази, аспартатаміно-трансферази, лужної фосфатази та креатиніну у сироватці крові під впливом магнітної нанотерапії у групах тварин, де зареєстрована максимальна протипухлинна дія, не мала статистично значущих відмінностей порівняно з групами тварин, у яких використовували офіційний доксорубіцин. Отримані результати свідчать, що використання магнітної нанотерапії не ініціює додаткову загальну токсичність. Це відкриває перспективи для подальшої розробки технології керованої локальної токсичності в межах допустимих доз компонентів МНК.

ВСТУП

Відомо, що хіміотерапія при злоякісних новоутвореннях асоціюється з підвищенням концентрації вільного заліза в крові. Декомпартметалізація іонів заліза супроводжується активацією пероксидного окислення ліпідів, руйнуванням біомембран, гемолізом і деструкцією залізотранспортних білків вільними радикалами $OH\cdot$, $NO\cdot$, H_2O_2 та $O_2\cdot$. У свою чергу, збільшення пулу вільного заліза в крові каталізує утворення вільних радикалів, які є вкрай токсичними сполуками. Доведено також роль порушень обміну ендogenous заліза та активних форм кисню в реалізації цитотоксичних ефектів багатьох протипухлинних препаратів, у тому числі доксорубіцину (ДР) [1]. Тому, незважаючи на активний розвиток сучасних методів лікування хворих на рак, загальні токсичні ефекти в організмі є настільки серйозними, що не завжди компенсуються позитивними результатами, які може дати протипухлинна хіміотерапія. Це частково зумовлено проблемами в реалізації ефекту керованої токсичності протипухлинних препаратів лише в межах дозування [2].

За останнє десятиріччя запропоновано нанотехнології, які здатні забезпечити таргетну доставку лікарських засобів та їхню пролонговану локально виражену протипухлинну дію [3]. Проведені експериментальні та клінічні дослідження продемонстрували певні перспективи у використанні технологій магнітної нанотерапії в лікуванні пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями. До них можна віднести: вищу ймовірність селективного накопичення магніточутливих наноконструктів (МНК) на основі наночастинок оксиду заліза магнетиту (Fe_3O_4) чи маггеміту (γFe_2O_3) у пухлинах та посилення локального протипухлинного ефекту за рахунок індукційної гіпертермії хіміотерапевтичного ефекту препаратів або безпосередньої абляції (вапоризації) пухлин за температури від 41 °С до понад 46 °С. Однак існує ціла низка невирішених проблем: 1) індукційна гіпертермія в злоякісних пухлинах за температури >41 °С може супроводжуватися формуванням термотолерантності (терморезистентності) на клітинному рівні внаслідок ініціації синтезу білків теплового шоку; 2) за температури

>45 °С відбувається суттєве зниження тканинної перфузії в злоякісних пухлинах; 3) накопичення наночастинок оксиду заліза в печінці та селезінці з подальшим його вивільненням із наночастинок іонів заліза та їх утилізація і біодеградація в організмі [4]. Таким чином, актуальним є вирішення завдання розробки технологій магнітної нанотерапії з низькою загальною і, що важливо, керованою локальною токсичністю препарату.

Підходом до подолання вищезазначених труднощів може бути розробка протипухлинної технології магнітної нанотерапії в умовах помірної радіочастотної гіпертермії в пухлині (до 38 °С) [5]. Механізм дії технології заснований на комбінованому впливі слабких постійних і змінних магнітних полів на кінетику магнітохімічних вільнорадикальних реакцій [6]. 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 призводити до формування активних форм кисню через реакцію пероксиду водню з іонами заліза (реакція Фентона), яку використовують для руйнування органічних речовин [7]. Застосування технології магнітної нанотерапії перспективне для підвищення локального протипухлинного ефекту МНК на основі наночастинки Fe₃O₄ та антрациклінового антибіотика ДР, протипухлинну дію якого пов'язують з вільнорадикальними реакціями, чия реакційна активність може залежати від концентрації заліза та магнітних характеристик МНК [8].

З урахуванням вищенаведеного метою роботи було проведення порівняльного дослідження протипухлинного впливу МНК із різними магнітними характеристиками та розподілу заліза у пухлині й сироватці крові у тварин із карциносаркомою Уокер-256 при магнітній нанотерапії.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Трансплантована карциносаркома Уокер-256. Дослідження протипухлинної активності ДР, МНК, постійного магнітного поля (ПМП) та електромагнітного опромінення (ЕО) проведено на 115 неінбредних самках щурів масою тіла 175±14 г розведення віварію Національного інституту раку. Щури перебували в стандартних умовах віварію з природним режимом освітлення і на повноцінному раціональному харчуванні.

Для експериментальних досліджень обрано карциносаркому Уокер-256, яка виникла спонтанно в грудній залозі ва-

гітних самок щурів-альбіносів [9]. Трансплантацію пухлинних клітин карциносаркоми Уокер-256 здійснювали шляхом введення щуром 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 тіла; МНК: ДР — 1,5 мг/кг, Fe₃O₄ — 3 мг/кг. Радіочастотну гіпертермію і введення препаратів у хвостову вену тварин об'ємом 0,3 мл в розчині 0,9% NaCl починали на 3-тю добу після перещеплення пухлини з частотою 1 раз на 2 доби. Локальне неоднорідне ЕО пухлини тварин здійснювали експериментальним прототипом апарату «Магнітерм» («Радмір», Україна) з магнітодипольним аплікатором, що мав голчатий локалізатор та неодимовий постійний магніт із максимальною магнітною індукцією ПМП 0,4 Тл на відстані 8 мм від кінця диполів і частотою ЕО 70 МГц з вихідною потужністю 75 Вт. Увесь курс складався з 5 ін'єкцій та 5 ЕО, а також впливу ПМП. Контроль температури здійснювали волоконно-оптичним термометром ТМ-4 («Радмір», Україна). Внутрішньопухлинна температура 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 р.

МНК. Як самостійні частини або складові препаратів були використані наночастинки оксиду заліза Fe₃O₄ діаметром <50 нм («Sigma-Aldrich», США) і ДР («Pfайзер», Італія). Механомагнітохімічний синтез МНК проводили за допомогою механомагнітного реактора «ММР1» (Національний інститут раку, Україна). МНК піддавали постійній механічній активації з інтенсивністю підведення 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 змінних параметрах ПМП неодимових магнітів протягом 5 хв [5]. Синтезовано два типи зразків МНК з відмінними магнітними характеристиками при дії (табл. 1) [10].

Радіоспектроскопія. Дослідження проведено на тваринах із перещепленою карциносаркомою Уокер-256. Тканини пухлини досліджували методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР)

за температури рідкого азоту (77 К). Для цього 500 мг тканини розміщували в спеціальну прес-форму і заморожували в рідкому азоті. Отриманий зразок досліджували на комп'ютеризованому спектрометрі ЕПР PE-1307. Якісні та кількісні зміни в функціонуванні електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій визначали за розташуванням сигналів ЕПР (g-фактор спектроскопічного розщеплення), а також вимірювали амплітуду відповідного сигналу в контрольних і дослідних зразках тканин. Досліджували стан FeS-білків N2 ЕТЛ мітохондрій (g-фактор 1,94); рівень флавоубісеміхінону в ЕТЛ мітохондрій (g-фактор 2,00); динаміку формування комплексів NO з FeS-білками в ЕТЛ мітохондрій N-типу (g-фактор 2,03); динаміку формування структурних змін в ЕТЛ мітохондрій за формуванням триплетного сигналу в спектрах ЕПР (g-фактор 2,007). Швидкість генерування супероксидних радикалів у мітохондріях клітин тканин вимірювали за допомогою спінового уловлювача — 1-гідроксин-2,2,6,6-тетраметил-1-4-окси-піперидин гідрохлориду (TEMPONE-H) та методу ЕПР у спеціальних парамагнітно чистих кварцових кюветках за температури 20 °С.

Біохімічний аналіз. Для визначення біохімічних показників сироватки крові щурів використовували автоматичний біохімічний аналізатор VITROS-250 (США) та стандартні набори реагентів фірми «Ortho-Clinical Diagnostics» (Великобританія). Концентрацію сироваткового заліза визначали колометричним методом із ферозином. Для насичення трансферину до сироватки крові додавали іонний розчин Fe³⁺. Після 5 хв інкубації та відокремлення незв'язаних іонів заліза за допомогою сорбенту обчислювали загальну залізов'язувальну здатність сироватки крові (ЗЗЗС) та відсоток насичення трансферину як відношення сироваткового заліза до ЗЗЗС. Рівень феритину у сироватці крові визначали реагентами фірми «BioSystems» (Іспанія) турбідиметричним методом преципітації антитілами.

Загальну токсичність протипухлинної терапії оцінювали за її впливом на печінку і нирки шляхом визначення таких біохімічних маркерів: аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ) (із пірідоксаль-фосфатом), лужної фосфатази (за перетворенням p-нітрофенілфосфату), сечової кислоти та креатиніну відповідно. Концентрацію субстратів визначали колориметричними методами: глюкози — глюкооксидазним, сечової кислоти — з уриказою, креати-

Таблиця 1. Магнітні характеристики зразків МНК при 38 °С*

Параметр	МНК1	МНК2
Магнітний момент насичення, m_s , емо/г	8,55	10,5
Коерцитивна сила H_c , Е	13,1	4,4
Площа петлі гістерезису, ерг/г	136,3	1135,4
g-Фактор	2,43	2,43

*ДР офіційний — діаманетик, питомий магнітний момент $m = -1,18$ емо/г, при 3000 Е.

ніну — методом Яффе без депротейнізації. Активність ферментів оцінювали стандартизованими ІФСС кінетичними методами.

Статистика. Для оцінювання нелінійної динаміки росту пухлин тварин використовували фактор росту ϕ та коефіцієнт гальмування пухлини κ [11]. Статистичний аналіз вірогідності отриманих даних проводили за допомогою t -критерію Стюдента з попередньою перевіркою гіпотези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова — Смірнова. Для аналізу даних використовували пакет прикладних програм Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Динаміка росту карциносаркоми Уокер-256. У табл. 2 наведено 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 статистично достовірною є різ-

за 3 міс спостереження статистично достовірно відрізнялися згідно з long-rank тестом ($\chi^2=4,92$; $p=0,027$). Після комбінованої дії МНК2, ПМП та ЕО відсоток тварин, що вижили на 90-й день експерименту, був у 2,1 раза вищим, ніж після аналогічної терапії, але із застосуванням МНК1. Різниця між зазначеними показниками виживаності також була статистично достовірною за критерієм long-rank тесту ($\chi^2=4,00$; $p=0,045$). Виживаність тварин після комбінованої дії МНК2, ПМП та ЕО була у 2,5 раза вищою, ніж після дії офіційного ДР, та у 8,6 раза вищою, ніж у тварин із контрольної групи. Виживаність тварин за 3 міс також статистично достовірно відрізнялася за log-rank тестом ($\chi^2=10,65$; $p=0,001$) [10].

Таким чином, встановлено, що поряд із раніше відомим фактом залежності ефекту магнітної нанотерапії від зовнішніх параметрів ПМП й ЕО зловласних пухлин [5] існує також залежність від власних магнітних параметрів МНК в умовах помірної індукційної гіпертермії до 38 °С у пухлині.

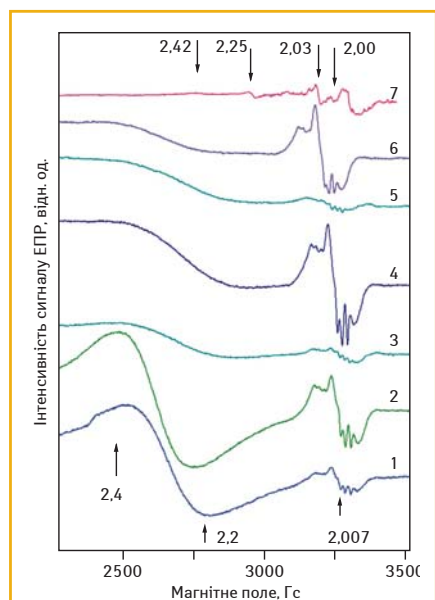


Рисунок. Спектри ЕПР карциносаркоми Уокер-256: 1 — контроль Уокер-256 (без впливу); 2 — офіційний ДР; 3 — МНК1; 4 — МНК2; 5 — МНК1 + ПМП + ЕО; 6 — МНК2 + ПМП + ЕО; 7 — тканина грудної залози вагітних тварин

Таблиця 2. Вплив наноконкомплексів із різними магнітними властивостями при дії ПМП та ЕО 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±0,01	1,00
2	Офіційний ДР	0,32±0,01 ¹	1,35
3	МНК1	0,40±0,01 ^{1,2}	1,09
4	МНК2	0,33±0,02 ^{1,3}	1,31
5	МНК1 + ПМП + ЕО	0,34±0,01 ^{1,3}	1,27
6	МНК2 + ПМП + ЕО	0,28±0,02 ^{1,3,5}	1,56

¹⁻⁵Статистично значущі відмінності порівняно з 1–5-ю групами тварин відповідно з рівнем значущості $p<0,05$.

ниця між протипухлинними ефектами МНК1 і МНК2 як без впливу, так і після спільної дії ПМП та ЕО. Протипухлинна дія МНК2 на основі розрахунку коефіцієнта гальмування росту пухлини в першому та другому випадках була, відповідно, на 20 та 23% більшою, ніж при МНК1.

При порівнянні отриманих результатів МНК із самостійною протипухлинною дією офіційного ДР на основі аналізу коефіцієнта гальмування росту пухлини слід зазначити, що лише у 6-й групі тварин після спільної дії МНК2 із 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 зафіксована часткова загибель тварин із великими розмірами пухлин.

Відносна кількість тварин, що вижили після терапії при використанні МНК2 на 90-ту добу після перещеплення пухлини, була у 4 рази більшою, ніж після дії МНК1. При цьому криві виживаності

8,8±0,67 відн. од. та комплексів NOFeS-білків у ЕТЛ мітохондрій клітин (сигнал ЕПР з $g=2,03$) до 0,41±0,09 відн. од. Це свідчить про подальше ініціювання пошкодження мітохондрій відомим протипухлинним фактором.

В умовах застосування МНК1 у тканині пухлини вміст комплексів вільного заліза знизився до значень 2,5±0,19 відн. од., знизився і рівень комплексів NOFeS-білків до 0,3±0,13 відн. од., а також рівень власне триплетного сигналу ЕПР. У 4-й групі тварин, які отримували МНК2, у пухлині зростає рівень вільного заліза до 4,1±1,13 відн. од., комплексів NO з FeS-білками N-типу — до 0,45±0,19 відн. од. Спектри ЕПР тканини пухлини мали схожі спектроскопічні характеристики при введенні тваринам МНК1 + ПМП + ЕО, як і при впливі МНК1. У 6-й групі тварин після впливу МНК2 + ПМП +

Радіоспектроскопія пухлини. У тканині (рисунок, табл. 3) пухлини тварин контрольної групи зареєстровано високий рівень комплексів вільного заліза 4,2±0,43 відн.од. (сигнал ЕПР з g -фактором спектроскопічного розщеплення 2,2–2,4). Під впливом офіційного ДР у тканині пухлини підвищується рівень вільного заліза до значень

Таблиця 3. Вплив наноконкомплексів із різними магнітними властивостями при дії ПМП та ЕО на вміст вільного заліза, швидкість генерування NO та O₂ у тканині карциносаркоми Уокер-256

№ групи	Серія дослідів	Комплекси вільного заліза (відн.од.), $g=2,2-2,4$	Комплекси NO з FeS-білками (відн. од.), $g=2,03$	NO (нмоль/г сирової тканини)	O ₂ (нмоль/г сирової тканини-хв)
1	Контроль Уокер-256 (без впливу)	4,2±0,43	0,12±0,07	2,4±0,16	0,45±0,11
2	Офіційний ДР	8,8±0,67 ¹	0,41±0,09 ¹	2,74±0,2 ¹	0,63±0,12
3	МНК1	2,5±0,19 ^{1,2}	0,3±0,13	1,91±0,16 ^{1,2}	0,38±0,10
4	МНК2	4,1±1,13 ²	0,45±0,19	2,82±0,11 ^{1,3}	0,68±0,14
5	МНК1 + ПМП + ЕО	2,5±0,88 ²	0,40±0,09 ¹	1,86±0,12 ^{1,2,4}	0,35±0,11
6	МНК2 + ПМП + ЕО	0,17±0,25 ¹⁻⁵	0,61±0,23	2,78±0,15 ^{3,5}	0,64±0,26
7	Тканина грудної залози вагітних тварин	—	0,25±0,03	1,5±0,09 ¹⁻⁶	0,23±0,12 ^{2,4}

¹⁻⁶Статистично значущі відмінності порівняно з 1–6-ю групами тварин відповідно з рівнем значущості $p<0,05$.

ЕО в пухлині виявлено найнижчий рівень вільного заліза. В інтактних тварин без пухлини сигналів ЕПР, які визначають рівень вільного заліза у тканинах, не зареєстровано.

Швидкість генерування супероксидних радикалів у пухлинах тварин 2-ї, 4-ї та 6-ї груп була в середньому у 2,8 рази вищою порівняно з тканинами тварин без пухлин.

Результати аналізу радіоспектроскопії пухлин в цілому свідчать про те, що використання МНК2 при магнітній нанотерапії пухлин ініціювало в пухлині зниження концентрації комплексів вільного заліза та збільшення оксиду азоту порівняно із застосуванням МНК1. Підвищення рівнів NO призводить до порушення функцій FeS-білків ЕТЛ мітохондрій, зростання швидкості генерування супероксидних радикалів у мітохондріях клітин, зниження рівнів гетерогенної клітинної гіпоксії та активності редоксзалежних ферментів [12].

Таким чином, можна констатувати, що використання технології магнітної нанотерапії відкриває перспективи для подальшої розробки ефекту керованої локальної токсичності на основі підбору оптимальних магнітних властивостей МНК.

Біохімічний аналіз сироватки крові.

Для розуміння взаємозв'язку ефекту розподілу заліза між пухлиною та організмом під впливом магнітної нанотерапії проведено біохімічний аналіз змін концентрації заліза та залізовмісних білків у сироватці крові тварин. У табл. 4 наведено вплив наноконкомплексів із різними магнітними властивостями при дії ПМП та ЕО на зміну концентрації заліза та залізовмісних білків у сироватці крові тварин з карциносаркомою Уокер-256 на 15-ту добу після перещеплення пухлини. Аналізуючи ці дані, слід відмітити, що вміст іонів заліза в сироватці крові зростає в середньому в 2,2 рази в усіх досліджених групах, незалежно від особливостей проведеної терапії, відносно показників як для тварин контрольної групи, так і тварин без пухлин. Концентрація феритину зростала у тварин 3-ї групи під впливом МНК1 порівняно з контрольною групою; він також мав статистично значущі відмінності порівняно з 4-ю та 5-ю групами тварин. 333С зростала лише під впливом МНК2 на 27% відносно контрольної групи. Процент насичення трансферину підвищувався в середньому на 105% під впливом усіх досліджених факторів стосовно показників як для тварин контрольної групи, так і тварин без пухлин. Слід відзначити, що всі досліджені показники не відрізнялися у тварин контрольної групи з карциносаркомою Уокер-256 від аналогічних у шурів без пухлин.

Відомо, що вплив хіміотерапевтичних протипухлинних препаратів супроводжується порушенням депонування заліза і його розподілом між тканинами та органами. Зіставляючи отримані експериментальні дані з наведеними у роботі [13], варто відмітити раніше відому тенденцію до підвищення вмісту заліза у сироватці крові під впливом хіміотерапії злоякісних новоутворень. На думку цитованих вище авторів, це зумовлено ефектом гемолізу з урахуванням того, що близько 60% заліза в організмі людини знаходиться у гемоглобіні крові. Підвищення концентрації сироваткового заліза закономірно супроводжувалося зростанням проценту насичення трансферину. Такі зміни у ланках транспортного процесу заліза зумовлювали у подальшому збільшення кількості залізовмісних сполук у групах дослідних тварин, основна з яких — металопротеїд феритин.

У табл. 5 наведено зміни концентрації глюкози та низки біохімічних сполук у сироватці крові тварин з карциносаркомою Уокер-256, які були використані для оцінки загальної токсичної дії технології магнітної нанотерапії.

Аналіз даних свідчить про те, що концентрація глюкози у всіх експериментальних тварин під впливом різних факторів терапії була в середньому на 94% вищою, ніж у тварин контрольної 1-ї групи, та наближалася

до значення цього показника у шурів, які не мали пухлин. Це узгоджується з відомим фактом про те, що хіміотерапія з використанням ДР ініціює підвищення рівня глюкози в крові [14]. Відомо також, що пухлинні тканини утилізують глюкозу зі значно більшою швидкістю, ніж нормальні, навіть в аеробних умовах. В організмі пухлинноносія виникає гіпоглікемія. При цьому поглинання кисню внаслідок гліколізу пригнічує цикл трикарбонових кислот (ефект Кребса). Цикл трикарбонових кислот — це ключовий етап дихання клітин, центр перетину метаболічних шляхів в організмі, проміжний етап між гліколізом та ЕТЛ. Кінцевим результатом цих пов'язаних шляхів є окислення поживних речовин для отримання необхідної хімічної енергії у формі аденозинтрифосфату. Вважають, що аеробний гліколіз у пухлинних клітинах, імовірно, відіграє роль механізму захисту від активних форм кисню [15]. Тому можна стверджувати, що отримані результати підвищення концентрації глюкози під впливом протипухлинної терапії у тварин із карциносаркомою Уокер-256 відносно показників у нелікованих шурів та вирівнювання до значень, що були у шурів без пухлин, підтверджують відомі уявлення.

Що стосується таких речовин, як сечова кислота, АлАТ, АсАТ, лужна фосфатаза та креатинін, концентрація яких

Таблиця 4. Вплив наноконкомплексів із різними магнітними властивостями при дії ПМП та ЕО на зміну концентрації заліза та залізовмісних білків у сироватці крові тварин із карциносаркомою Уокер-256

№ групи	Серія дослідів	Залізо, мкмоль/л	Феритин, мкг/л	333С, мкмоль/л	Насичення трансферину, %
1	Контроль Уокер-256 (без впливу)	15,4±1,2	158,6±10,3	68,8±4,9	22,6±0,8
2	Офіційний ДР	38,4±2,6 ¹	204,5±22,3	77,0±2,8	50,3±3,9 ¹
3	МНК1	31,0±3,9 ¹	243,8±21,9 ¹	68,2±8,0	45,7±2,9 ¹
4	МНК2	38,2±3,4 ¹	161,3±16,7 ³	87,5±6,1 ¹	43,6±2,4 ¹
5	МНК1 + ПМП + ЕО	34,1±3,1 ¹	147,4±20,9 ³	77,6±5,1	44,4±3,9 ¹
6	МНК2 + ПМП + ЕО	35,3±4,6 ¹	192,3±24,9	73,3±9,4	48,6±2,5 ¹
7	Тварини без пухлин	16,7±0,77 ²⁻⁶	171,3±11,2 ³	70,8±3,2 ⁴	22,8±1,5 ²⁻⁶

¹⁻⁶Статистично значущі відмінності порівняно з 1–6-ю групами тварин із рівнем значущості $p < 0,05$.

Таблиця 5. Вплив наноконкомплексів із різними магнітними властивостями при дії ПМП та ЕО на зміну концентрації біохімічних показників у сироватці крові тварин із карциносаркомою Уокер-256

№ групи	Серія дослідів	Глюкоза, ммоль/л	Сечова кислота, мкмоль/л	АлАТ, U/L	АсАТ, U/L	Лужна фосфатаза, U/L	Креатинін, мкмоль/л
1	Контроль Уокер-256 (без впливу)	3,0±0,46	112,3±2,8	85,4±4,9	270,6±23,9	271,2±15,3	66,0±2,3
2	Офіційний ДР	6,0±0,42 ¹	95,9±5,7 ¹	88,7±7,2	324,7±13,5	238,2±28,2	68,7±2,4
3	МНК1	5,4±0,67 ¹	96,5±9,5	105,5±8,7	286,8±13,3	269,5±24,0	67,8±2,2
4	МНК2	6,6±0,51 ¹	81,3±4,7 ¹	93,5±6,9	314,8±31,6	334,8±21,0 ^{1,2}	59,3±4,1
5	МНК1 + ПМП + ЕО	6,0±0,62 ¹	83,6±6,7 ¹	79,7±5,0 ³	302,4±21,2	212,7±25,5 ⁴	63,3±3,0
6	МНК2 + ПМП + ЕО	5,1±0,78 ¹	96,3±8,7	92,4±8,4	288,3±9,3 ²	238,3±17,9 ⁴	64,7±4,0
7	Тварини без пухлин	7,9±0,28 ¹⁻⁶	97,8±4,2 ^{1,4}	80±3,03 ³	243,5±13,8 ^{2,3,5,6}	284,7±11,3 ⁴⁻⁶	61,7±2,5

¹⁻⁶Статистично значущі відмінності порівняно з 1–6-ю групами тварин із рівнем значущості $p < 0,05$.

у сыворотці крові характеризує токсичну дію технології магнітної нанотерапії, то у тварин 6-ї групи, в якій зареєстровано максимальну протипухлинну дію, всі визначені біохімічні показники не мали статистично значущих відмінностей порівняно з 2-ю групою тварин, в якій застосовували офіційний ДР. Таким чином, це свідчить про те, що використання технології магнітної нанотерапії з МНК2 не ініціює додаткової загальної токсичності.

ВИСНОВКИ

1. Магнітна нанотерапія з використанням МНК з площею петлі гістерезису 1135,4 ерг/г ініціює більший коефіцієнт гальмування росту пухлини — на 23%, ніж при використанні наноконструкції з меншою площею петлі гістерезису 136,3 ерг/г.
2. Вміст комплексів вільного заліза був мінімальним у карциносаркомі Уокер-256 після магнітної нанотерапії з МНК, який мав площу петлі гістерезису 1135,4 ерг/г, а максимальний рівень вільного заліза відзначали у тварин після впливу офіційного ДР.

3. Концентрація іонів заліза та процент насичення трансферину в сыворотці крові в усіх досліджених групах, незалежно від особливостей проведеної терапії, зростали в середньому в 2,2 та 2 рази відносно показників як у тварин контрольної групи, так і тварин без пухлин.

4. У тварин з карциносаркомою Уокер-256, у яких зареєстровано максимальну протипухлинну дію при використанні МНК з площею петлі гістерезису 1135,4 ерг/г, концентрація АлАТ, АсАТ, лужної фосфатази та креатиніну не мала статистично значущих відмінностей порівняно з групою тварин, в якій застосовували офіційний ДР.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 12: 1161–1208.
2. Smith A.D., Roda D., Yap T.A. (2014) Strategies for modern biomarker and drug development in oncology. *J. Hematol. Oncol.*, 7(1): 70.
3. Gowda R., Jones N.R., Banerjee S., Robertson G.P. (2013) Use of nanotechnology to develop multi-drug inhibitors for cancer therapy. *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 4(6): 1–16.
4. Amiji M.M. (2007) Nanotechnology for cancer therapy. Boca Raton: CRC Press, 820 p.

5. Орел В., Дзятковская Н., Романов А. (2013) Магнитная нанотерапия рака. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing, 224 с.
6. Salikhov K.M., Molin Y.N., Sagdeev R.Z. (1984) Spin polarization and magnetic effects in radical reactions. Amsterdam: Elsevier, 419 p.
7. Gielen M., Tiekink E.R. (2005) Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents — the use of metals in medicine. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 598 p.
8. Orel V.E., Shevchenko A.D., Nikolov N.A. et al. (2014) Comparative study of magnetic properties and antitumor effect of nanocomplexes from oxides iron nanoparticles and doxorubicin during radio-frequency hyperthermia of the Walker-256 carcinosarcoma. *Nano LIFE*, 4(2), DOI: 10.1142/S179398441500032.
9. Stewart H.L., Snell K.C., Dunham L.J., Schlyen S.M. (1959) Atlas of tumor pathology sect. XII, Fase. 40. Washington, DC: Air Force Institute of Pathology: 216–271.
10. Орел В.Е., Шевченко А.Д., Рихальський О.Ю. та ін. (2014) Магнітна нанотерапія тварин із карциносаркомою Уокер-256. Доповіді Національної Академії Наук України, 11: 172–179.
11. Эмануэль Н.М. (1977) Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. М.: Наука, 419 с.
12. Бурлака А.П., Сидорик Є.П. (2006) Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. К.: Наукова думка, 228 с.
13. Follézou J.Y., Bizon M. (1986) Cancer chemotherapy induces a transient increase of serum-iron level. *Neoplasma*, 33(2): 225–231.
14. Geetha A., Catherine J., Shyamala Devi C.S. (1989) Effect of α -tocopherol on doxorubicin induced alterations in glucose metabolism — A pilot study. *J. Biosci.*, 14: 243–247.
15. Осинский С., Ваупель П. (2009) Микрофизиология опухолей. Киев: Наукова думка, 256 с.

Противоопухолевый эффект и распределение железа в опухоли и сыворотке крови при магнитной нанотерапии карциносаркомы Уокер-256

В.Э. Орел¹, В.А. Мельник¹, А.В. Романов¹, А.Ю. Рыхальский¹, А.П. Бурлака², С.Н. Лукин², И.Б. Щепотин¹

¹Национальный институт рака, Киев

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

Резюме. Магнитная нанотерапия с использованием магниточувствительного наноконструкта (МНК), в состав которого входили наночастицы Fe₃O₄ и доксорубин с площадью петли гистерезиса 1135,4 эрг/г, инициирует больший коэффициент торможения роста карциносаркомы Уокер-256 (на 23%), чем при использовании МНК с меньшей площадью петли гистерезиса 136,3 эрг/г. Содержание комплексов свободного железа было минимальным в карциносаркоме Уокер-256 после магнитной нанотерапии с МНК, который имел большую площадь петли гистерезиса, а максимальный уровень свободного железа отмечали у животных после воздействия официального доксорубина. Концентрация ионов железа в сыворотке крови возрастала в среднем в 2,2 раза во всех исследованных группах независимо от особенностей проводимой терапии относительно показателей как для животных контрольной группы, так и животных без опухолей. Концентрация мочево́й кислоты, аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и креатинина в сыворотке крови под влиянием магнитной нанотерапии в группах животных, где зарегистрировано максимальное противоопухолевое действие, не имела статистически значимых различий по сравнению с группами животных, в которых использовали официальный доксорубин. Полученные результаты свидетельствуют, что использование магнитной нанотерапии не инициирует дополнительной общей токсичности. Это открывает перспективы для дальнейшей разработки технологии управляемой локальной токсичности в пределах допустимых доз компонентов МНК.

Ключевые слова: карциносаркома Уокер-256, магнитная нанотерапия, магниточувствительный наноконструкт, железо, трансферин, доксорубин.

Antitumor effect and the distribution of iron in the tumor and blood serum during magnetic nanotherapy of Walker-256 carcinosarcoma

V.E. Orel¹, V.O. Melnik¹, A.V. Romanov¹, A.Y. Rykhalskiy¹, A.P. Burlaka², S.M. Lukin², I.B. Shepotin¹

¹National Cancer Institute, Kyiv

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

Summary. Magnetic nanotherapy by the magnetosensitive nanocomplex (MNC) comprised of Fe₃O₄ nanoparticles and doxorubicin with a hysteresis loop area of 1135.4 erg/g has initiated greater growth inhibition factor of carcinosarcoma Walker-256 on 23% as compared to the MNC with lesser hysteresis loop area of 136.3 erg/g. The content of free iron complexes was minimal in carcinosarcoma Walker-256 after magnetic nanotherapy by MNC with a large hysteresis loop area, and the maximum level of free iron was observed in animals after exposure to conventional doxorubicin. The concentration of iron ions in the blood serum increased in 2.2 times on the average in all studied groups, regardless of received treatment, as compared to the control group and animals without tumors. The concentration of uric acid, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, and creatinine in the serum of the animals with the greatest antitumor effect of magnetic nanotherapy did not statistically differed from the animals treated by conventional doxorubicin. Obtained results testified that magnetic nanotherapy did not initiated additional overall toxicity. This opens up the opportunities for further development of the technology for controlled local toxicity within the allowable dose components MNC.

Key words: carcinosarcoma Walker-256, magnetic nanotherapy, magnetosensitive nanocomplex, iron, transferrin, doxorubicin.