

В.Е. Орел¹, Л.А. Сивак¹, М.С. Кротевич¹, О.Й. Дасюкевич¹, О.Ю. Рихальський¹, І.В. Орел¹,
А.П. Бурлака², С.М. Лукін²

Комбінований вплив вінорельбіну з наночастинками оксиду заліза й електромагнітного випромінювання на карциному легені Льюїс

¹Національний інститут раку, Київ

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

Одержано 1.03.2019

Прийнято до друку 28.05.2019

DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.39.22663

Мета. Вивчення можливості підвищення ефективності протипухлинної хіміотерапії вінорельбіном під дією комбінованого впливу наночастинок оксиду заліза та електромагнітного випромінювання на тварин з карциною легені Льюїс. **Об'єкт і методи.** У дослідженнях використано 40 самців мишей лінії C57Bl/6 масою тіла 18–20 г, наночастинки Fe₃O₄ (Sigma-Aldrich) діаметром <50 нм і вінорельбін. Локалізоване електромагнітне опромінення (ЕО) пухлин проводили за допомогою апарата «Магнітерм» (Радмір, Україна) з вихідною потужністю 75 Вт. Тривалість сеансу ЕО становила 15 хв. Гістологічне типування новоутворень проведено з використанням рутинного забарвлення гематоксиліном і еозином та імуногістохімічного дослідження. Для дослідження редокс-стану пухлин та печінки вивчали спектри електронного парамагнітного резонансу, які реєстрували на комп'ютеризованому спектрометрі PE1307. **Результати.** Комплекс вінорельбіну та наночастинок з ЕО мав на 16% більший протипухлинний ефект і в 3,5 рази вищий індекс інгібування метастазів, ніж офіційний препарат. Результати гістологічних досліджень свідчать, що дія офіційного вінорельбіну ініціювала збільшення некрозу пухлин на 34% проти контрольної групи. Комбінована дія вінорельбіну з наночастинками з/без ЕО збільшувала некроз карциноми легені Льюїс до 44% у порівнянні із контрольною групою. **Висновки.** Комбінований вплив вінорельбіну з наночастинками та локального електромагнітного випромінювання на карциному легені Льюїс ініціював більший коефіцієнт гальмування росту пухлини, індекс інгібування метастазування та некроз при слабковираженій експресії бета-тубуліну, ніж офіційного вінорельбіну. Гепатотоксичні ефекти при комбінованому лікуванні були менш вираженими, ніж під впливом офіційного вінорельбіну.

Ключові слова: вінорельбін; наночастинки; карцинома легені Льюїс; метастази; β-тубулін; помірна гіпертермія; електромагнітне випромінювання.

ВСТУП

За даними Міжнародної агенції SEER, 5-річна виживаність хворих на рак грудної залози всіх стадій становить близько 89,7%. Кращий результат (5-річна виживаність — 98,7%) відмічається у пацієнтів з локалізованим раком грудної залози. Але у 6% хворих на рак грудної залози з метастазами цей показник становить лише 27% [1]. В Україні у 2015 р. загальна кількість померлих від раку грудної залози досягла 5911 осіб [2], і тому актуальною є проблема підвищення ефективності хіміотерапії хворих на рак цієї локалізації.

Один з протипухлинних препаратів, який зазвичай застосовують при лікуванні метастатичного раку грудної залози, є вінорельбін [3, 4]. Вінорельбін — напівсинтетичний хіміотерапевтичний лікарський препарат групи сполук, відомих як похідні алкалоїду барвінку рожевого, що були отримані з *Catharanthus roseus*, *Vinca rosea*, *Lochnera rosea* або *Ammocallis rosea*. Препарат належить до підгрупи антимікротубулярних агентів [5].

Розглянемо механізми дії вінорельбіну, які можливо було б використати для посилення його протипухлинного ефекту. Відомо, що алкалоїди *Vinca* індукують низку шляхів апоптотичної передачі сигналу. Ефект впливу вінорельбіну опосередковано через родину білків Bcl-2 і родину каспазних білків, які беруть участь у регуляції та індукції процесів апоптозу. Апоптотичний ефект вінорельбіну також пов'язаний з відповіддю на внутрішні сигнали мітохондріального апоптотичного механізму загибелі клітин [6].

Раніше було показано, що кожен з ряду α-, β- і γ-тубулінів має електричний заряд із дипольним моментом та орієнтацією за вектором електричного поля [7]. На підставі цього факту експериментально доведено, що електромагнітне поле може впливати на структуру та архітектоніку мікротрубочок [8]. Також показано, що імпульсні електричні поля можуть ініціювати загибель злоякісних клітин. Припускають, що ефект

індукції апоптозу пухлинних клітин пов'язаний з дією Ca²⁺-залежних білків у їхній мітохондріальній мембрані [9].

Використання нанотехнологій у лікуванні раку дає можливість знищити пухлинні клітини електромагнітними полями, які можуть бути поглинені, та ініціювати механохімічні порушення [10], радіочастотну гіпертермію [11] чи локально стимулювати токсичний ефект, опосередкований продуктами оксидативного стресу за допомогою наночастинок (НЧ) оксиду заліза, у комплексі з протипухлинним препаратом [12]. У попередніх роботах встановлено, що радіочастотна гіпертермія, або абляція, у поєднанні з тривало циркулюючими ліпосомальними НЧ та вінорельбіном підвищувала ступінь локальної деструкції пухлини і виживаність тварин з аденокарциною печінки H22 [13].

Однак існує низка обмежень для радіочастотної гіпертермії з використанням НЧ: 1) терапія НЧ в інтервалі температур 43–70 °C може супроводжуватися утворенням хіміорезистентності за рахунок індукції білків теплового шоку; 2) температура >45 °C може зменшити перфузію пухлинної тканини; 3) неможливість лікування дисемінованого пухлинного процесу [14].

В якості перспективного напрямку подолання вищезазначених проблем може бути запропонована технологія, яка базується на використанні вінорельбіну з магнітними НЧ, що можуть спричиняти пошкодження білка тубуліну та ініціювати оксидативний стрес електромагнітним збудженням [15, 16].

Виходячи з цього, метою роботи є вивчення можливості підвищення ефективності протипухлинної хіміотерапії вінорельбіном за допомогою комбінованого впливу НЧ оксиду заліза та електромагнітного випромінювання на тварин з карциною легені Льюїс.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ

У дослідженні використані самці мишей лінії C57Bl/6 (n=40, маса тіла 18–20 г) розведення віварію Національного інституту

раку. Карциному легені Льюїс трансплантували тваринам шляхом ін'єкції 30% суспензії клітин (0,4 мл) у середовищі 199 у стегно, як описано в роботі [17]. Тварин розділили на 4 групи, по 10 мишей у кожній: 1-ша — контроль (без лікування); 2-га — офіційний вінорельбін; 3-тя — вінорельбін та електромагнітне опромінення (ЕО), 4-та — вінорельбін і магнітні НЧ + ЕО. Препарати в об'ємі 0,2 мл вводили внутрішньоочеревинно у таких концентраціях: вінорельбін 5 мг/кг або НЧ 3 мг/кг + вінорельбін 5 мг/кг. Розмір пухлини вимірювали за допомогою штангенциркуля. Через 25 днів після трансплантації пухлини досліджували кількість та об'єм метастатичного ураження у легенях [18, 19].

Використовували НЧ Fe_3O_4 (Sigma-Aldrich) діаметром <50 нм і вінорельбін. Лікування починали на 2-й день після трансплантації пухлини, процедуру проводили п'ять разів через день. Для мінімізації впливу температури на магнітні властивості НЧ використовували метод індукційної пірної гіпертермії. Локалізоване ЕО пухлин проводили за допомогою експериментального прототипу апарату «Магнітерм» (Радмір, Україна) з вихідною потужністю 75 Вт. Для контролю температури усередині пухлин використовували волоконно-оптичний термометр ТМ-4 (Радмір, Україна). Температура всередині пухлини не перевищувала $39,1^{\circ}C$ через 15 хв після початку сеансу ЕО. Тривалість сеансу ЕО становила 15 хв, який починали відразу після введення нанокмплесу на основі магнітних НЧ та вінорельбіну.

Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно з нормами, встановленими Законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», і нормами, прийнятими у Європейській конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, від 18.03.1986 р.

Нелінійну кінетику росту пухлини оцінювали через фактор росту ϕ за допомогою автокаталітичного рівняння та з використанням коефіцієнта гальмування:

$$k = \phi_c / \phi_e, \quad (1)$$

де ϕ_c — фактор росту для контрольної групи; ϕ_e — фактор росту для досліджуваної групи [20].

Гістологічне тигування новоутворень проведено з використанням рутинного забарвлення гематоксилином і еозином та імуногістохімічного дослідження. Отриманий матеріал фіксували в забуференому 10% формаліні з рН 7,4 та ущільнювали у парафіні із застосуванням гістопроектора Histos-5 («Milestone», Італія). Із парафінових блоків виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5 мкм за допомогою мікротому Microm HM325 (ThermoScientific, Німеччина). Зрізи забарвлювали гематоксилином і еозином для загальної оцінки пухлини. Імуногістохімічну реакцію проводили з антитілами до β -тубуліну (ThermoScientific, Німеччина) з використанням системи детекції EnVisionTM FLEX (Dako, Данія). Демаскування антигену проводили у цитратному буфері рН 6,0 при $95^{\circ}C$. Первинні антитіла інкубували при кімнатній температурі 30 хв, вторинні — 20 хв. Зрізи дофарбовували гематоксилином Gill. Для позитивного контролю використовували тканинні зразки з визначеною позитивною реактивністю, для негативного — проводили процедуру без застосування первинних антитіл. Отримані мікропрепарати фотографували і аналізували за допомогою мікроскопа OLYMPUS CX41 із цифровою камерою і програмним забезпеченням QuickPHOTO MICRO 2.3 за стандартних умов. Відсоток некротичних зон у тканині пухлини оцінювали згідно з [21].

Для дослідження редокс-стану пухлин та печінки вивчали спектри електронного парамагнітного резонансу (ЕПР), які реєстрували на комп'ютеризованому спектрометрі PE1307 в циліндричному резонаторі з типом коливань H011 на частоті $9,15 \pm 0,01$ ГГц. Потужність надвисокочастотного випромінювання становила 40 мВт. Використовували модуляцію магнітного поля амплітудою 10 Гс та частотою 100 кГц. Зразки тканин досліджували в парамагнітно чистому кварцовому Д'юарі за температури $-196^{\circ}C$ (рідкого азоту). Об'єм проби становив 30 мкл. У пухлині досліджували інтенсивність триплетного сигналу ЕПР з g-фактором 2,007 — спектроскопічним маркером, що характеризує стан електронно-тран-

спортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій клітин пухлини. Зміни його інтенсивності характеризують рівень клітинної гіпоксії та ішемії. У печінці тварин-пухлинносів досліджували зміни інтенсивності сигналу ЕПР при таких g-факторах: g-фактор 2,25, що характеризує активність низькоспінової форми цитохрому P450 у редокс-циклі системи детоксикації гепатоцитів; g-фактор 2,00 — рівень флавобісеміхінонів в ЕТЛ мітохондрій гепатоцитів; g-фактор 1,94 — активність FeS-білка N2 типу в НАДН-убіхіноноксидоредуктазному комплексі ЕТЛ мітохондрій гепатоцитів.

Статистичний аналіз вірогідності отриманих даних проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента з попередньою перевіркою гіпотези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова — Смірнова. Для аналізу даних використовували пакет прикладних програм Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати аналізу нелінійної кінетики росту карциноми легені Льюїс з 7-ї по 24-ту добу після перещеплення пухлини наведено у табл. 1. Порівняльний аналіз свідчить, що комплекс вінорельбіну та НЧ з ЕО мав більший протипухлинний ефект, ніж офіційний препарат. За результатом розрахунку фактора росту, пухлини у 4-й групі тварин були меншими відповідно на 16 та 10% у порівнянні із групою тварин, які отримували лише вінорельбін та вінорельбін з ЕО. З результатів, наведених у табл. 2, можна зробити висновок, що мінімальний середній розмір метастазів та максимальний індекс інгібування метастазів були зафіксовані у 4-й групі тварин після комбінованого впливу комплексу вінорельбіну з НЧ оксиду заліза та ЕО. Середні розміри метастазів у 4-й групі тварин у порівнянні з 2-ю та 3-ю групами, що отримували лише вінорельбін та вінорельбін з ЕО, були відповідно в 3,5 та 1,7 раза меншими. У 2-й та 3-й групах тварин відзначалася лише тенденція до зменшення фактора росту пухлини.

Таблиця 1. Кінетика росту карциноми легені Льюїс (M \pm m)

Група	Вид впливу	Фактор росту пухлини, доба ⁻¹	Коефіцієнт гальмування росту пухлини k, відн. од.
1	Контроль (без впливу)	0,34 \pm 0,01	1,00
2	Офіційний вінорельбін	0,33 \pm 0,01	1,09
3	Вінорельбін + ЕО	0,31 \pm 0,01	1,10
4	Вінорельбін + НЧ + ЕО	0,28 \pm 0,01*.*	1,21

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

*Статистично значущі відмінності порівняно з групою 2, рівень значущості $p < 0,05$.

Таблиця 2. Метастазування тварин з карциномою легені Льюїс

Група	Вид впливу	Середній розмір метастазів, мм ³	Індекс інгібування метастазів
1	Контроль (без впливу)	0,73 \pm 0,13	—
2	Офіційний вінорельбін	1,42 \pm 0,40	—
3	Вінорельбін + ЕО	0,69 \pm 0,17	6%
4	Вінорельбін + НЧ + ЕО	0,40 \pm 0,10*.*	37%

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

*Статистично значущі відмінності порівняно з групою 2, рівень значущості $p < 0,05$.

Аналіз експериментально зареєстрованої нелінійної кінетики росту і процесів метастазування карциноми легені Льюїс підтримує раніше сформоване визначення нелінійних особливостей онкогенезу. А саме, при онкогенезі типовим є посилення дезорганізації, що ініціює стохастичний процес на всіх рівнях біологічної ієрархічної організації організму. Проявом останнього можуть бути різні порушення у білках, кодованих «протоонкогенами» і «пухлинними супресорами», що призводить до порушення регуляції сигнальних шляхів, які контролюють клітинний цикл, апоптоз, генетичну стабільність, диференціацію та морфогенетичні реакції клітин [22].

При дослідженні гістологічних препаратів пухлинних тканин у тварин на 24-й день спостереження після перещеплення карциноми легені Льюїс відмічали такі характерні патомор-

фологічні особливості та зміни експресії β -тубуліну. У контрольній 1-й групі (рис. 1) простежувалися поперечна смугастість тканин, зони некрозу до 21% та виражена експресія β -тубуліну. У 2-й групі (рис. 2) під впливом вінорельбіну зони некрозу становили до 55% із середньовираженою експресією β -тубуліну. У 3-й групі (рис. 3) під впливом вінорельбіну та НЧ відмічалися клітини з дистрофічними та некробіотичними змінами, зони некрозу становили до 60–65% та була середньовиражена експресія β -тубуліну. У 4-й групі (рис. 4) під впливом вінорельбіну та НЧ з ЕО візуалізувалися тканини з дистрофічними і некробіотичними змінами, некротичними зонами, які становили до 60–65%, та була незначна експресія β -тубуліну.

Результати гістологічних досліджень свідчать, що дія офіціального вінорельбіну ініціювала збільшення некрозу пухлин на 34% у 2-й групі тварин проти 1-ї контрольної групи. Комбінована дія вінорельбіну з НЧ у 3-й та 4-й групах тварин збільшувала некроз карциноми легені Льюїс до 44% у порівнянні з контрольною групою. При цьому, якщо в 1-й, 2-й та 3-й групах тварин відмічали виражену та середньовиражену експресію β -тубуліну, то в 4-й групі, де був найбільший коефіцієнт гальмування росту пухлини, цей показник слабковиражений. Отримані дані підтверджують попередні відомості про те, що визначення експресії β -тубуліну може бути одним із незалежних предикторів прогресування злоякісної пухлини [23].

Механізм підвищення протипухлинного ефекту вінорельбіну при використанні ЕО можна інтерпретувати наступним

чином: мікротрубочки клітин являють собою порожнисті циліндричні білкові полімери, які складаються з тубулінових α - та β -гетеродимерів. Димери спонтанно збираються поздовжньо для утворення протофіламентів у формі мікротрубочок, що призводить до спірального розташування гетеродимерів тубулінів. Маючи діаметр приблизно 25 нм, мікротрубочки утворюють жорстку, інтегральну структуру цитоскелета еукаріотичної клітини [24]. Відомо, що протипухлинна дія вінорельбіну заснована на інгібуванні полімеризації тубуліну. Препарат зв'язується переважно з мітотичними мікротрубочками та зумовлює мітотичне блокування і зрештою — апоптоз клітин [25]. Щодо тлумачення ефекту дії ЕО, то слід відмітити наступне. Електричний заряд та дипольний розподіл тубуліну у мікротрубочках може впливати на механізм поділу клітин [26]. Тому локальне електромагнітне випромінювання також може впливати на конформаційні зміни стану тубулінів [27]. Тобто, виходячи з вищезазначеного, зареєстроване більш суттєве зменшення вираженої експресії β -тубуліну в 3-й та 4-й групах цілком логічно пов'язано з дією ЕО.

На рис. 5 наведено спектри ЕПР карциноми легені Льюїс та печінки тварин-пухлиноносіїв. У табл. 3 показано рівні змін інтенсивності сигналу ЕПР карциноми легені Льюїс щодо контролю, а в табл. 4 — зміни ЕПР-сигналу у печінці тварин-пухлиноносіїв. Отримані дані свідчать, що інтенсивність сигналу ЕПР карциноми легені Льюїс щодо контролю у 2–4-й групах тварин була нижчою, ніж у контрольній групі,

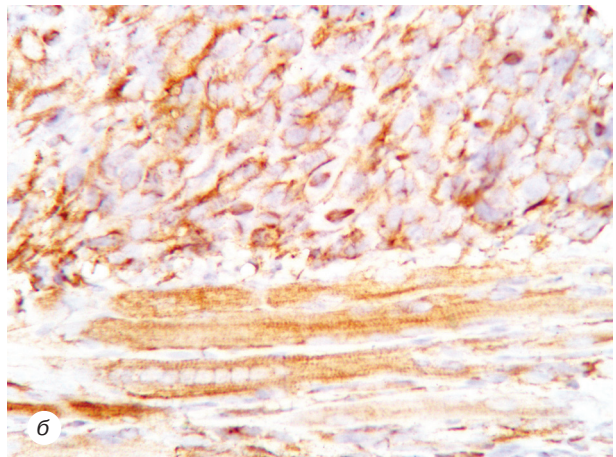
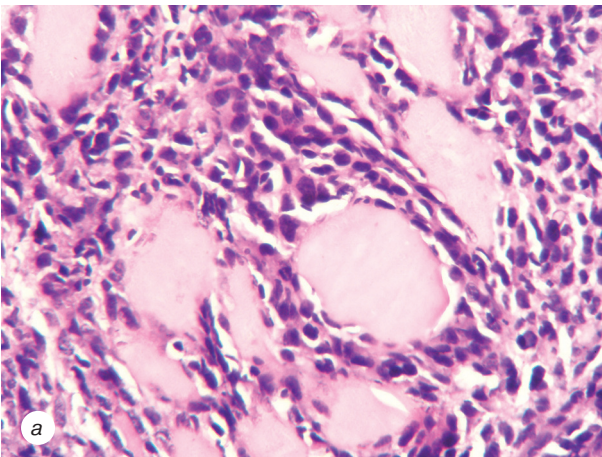


Рис. 1. Контрольна 1-ша група (без впливу): а — м'язові волокна, поперечний зріз карциноми легені Льюїс, забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. $\times 400$; б — поздовжній зріз м'язових волокон, експресія β -тубуліну. Зб. $\times 400$

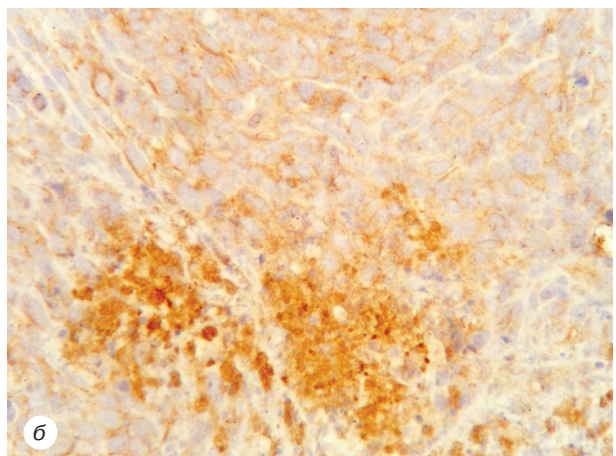
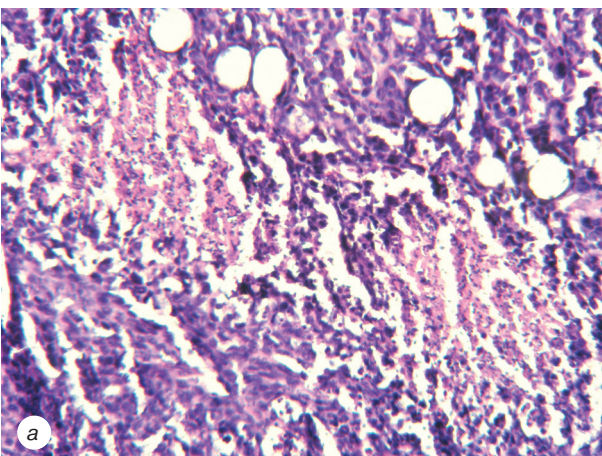


Рис. 2. 2-га група (вінорельбін): а — м'язові волокна, поперечний зріз карциноми легені Льюїс, забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. $\times 100$; б — поздовжній зріз м'язових волокон, експресія β -тубуліну. Зб. $\times 200$

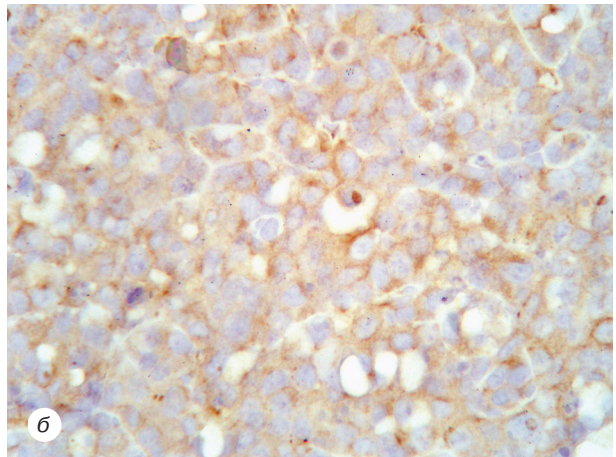
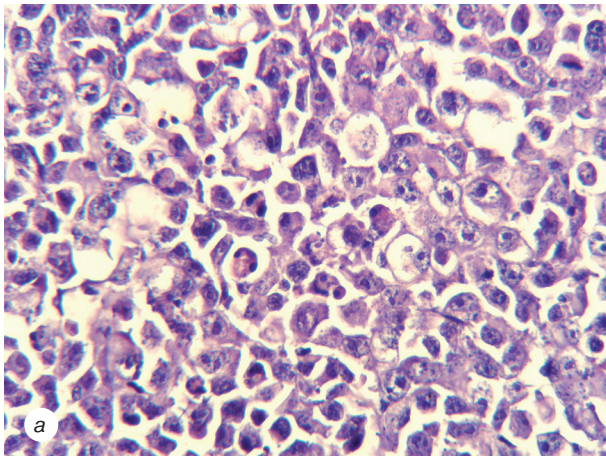


Рис. 3. 3-тя група (вінорельбін + ЕО): а — м'язові волокна, поперечний зріз карциноми легені Льюїс, забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. $\times 400$; б — поздовжній зріз м'язових волокон, експресія β -тубуліну. Зб. $\times 400$

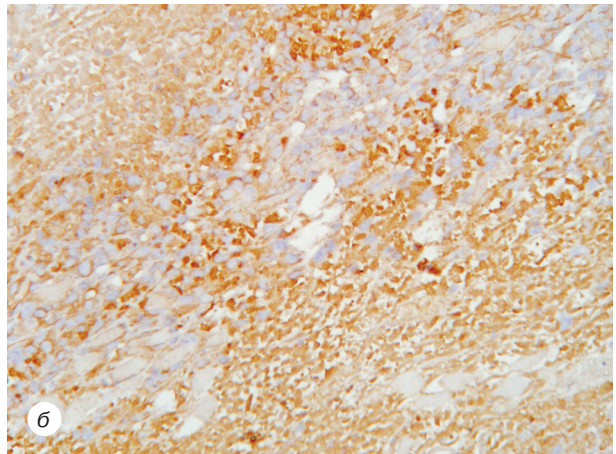
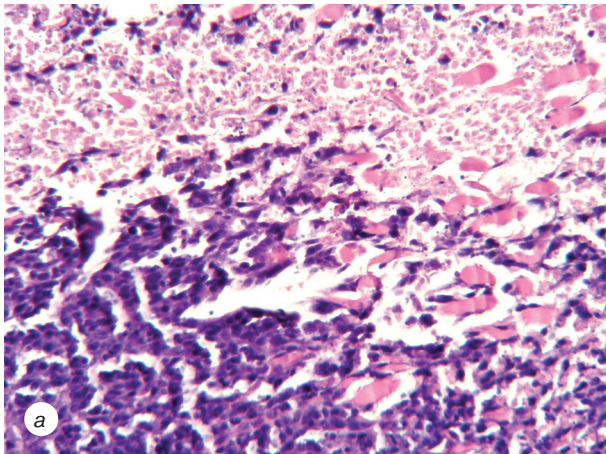


Рис. 4. 4-та група (вінорельбін + НЧ + ЕО): а — фрагменти м'язових волокон карциноми легені Льюїс, забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. $\times 200$; б — поздовжній зріз м'язових волокон, експресія β -тубуліну. Зб. $\times 200$

4

в середньому на 47%. Аналіз зміни ЕПР-сигналу у печінці тварин-пухлиноносців виявив, що самостійна дія вінорельбіну спричинила суттєвіші зміни досліджуваного показника при різних g -факторах, ніж комбінований вплив препарату з ЕО чи НЧ + ЕО. Дані 3-ї та 4-ї груп достовірно не відрізнялися від показників 1-ї контрольної групи тварин та були нижчими за такі 2-ї групи в середньому на 43% при g -факторі 2,25, на 39% — при g -факторі 2,00 та на 56% — при g -факторі 1,94.

Таблиця 3. Інтенсивність сигналу ЕПР карциноми легені Льюїс

Група	Експеримент	Інтенсивність спектра, відн. од.
1	Контроль (без впливу)	1,00 \pm 0,76
2	Вінорельбін	0,54 \pm 0,061*
3	Вінорельбін + ЕО	0,52 \pm 0,050*
4	Вінорельбін + НЧ + ЕО	0,53 \pm 0,049*

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

Таблиця 4. Зміни ЕПР-сигналу у печінці тварин-пухлиноносців

Група тварин	Експеримент	g -фактор, відн. од.		
		2,25	2,00	1,94
1	Контроль (без впливу)	0,35 \pm 0,03	0,21 \pm 0,024	0,47 \pm 0,053
2	Вінорельбін	0,59 \pm 0,06*	0,36 \pm 0,040*	1,07 \pm 0,93*
3	Вінорельбін + ЕО	0,28 \pm 0,03*	0,22 \pm 0,02*	0,52 \pm 0,05*
4	Вінорельбін + НЧ + ЕО	0,40 \pm 0,04*	0,22 \pm 0,02*	0,45 \pm 0,038*

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

*Статистично значущі відмінності порівняно з групою 2, рівень значущості $p < 0,05$.

Узагальнюючи результати досліджень спектрів ЕПР, слід зазначити, що інтенсивність сигналів ЕПР у 2–4-й групах тварин суттєво не відрізнялася та були нижчою, ніж у 1-й контрольній групі. Тобто кількість вільних радикалів (парамагнітних центрів) у досліджених пухлинах тварин 2–4-ї груп під впливом офіційного вінорельбіну та комбінованого впливу препаратів з ЕО була майже однаковою. Що стосується зміни ЕПР-сигналу у печінці тварин-пухлиноносців, то слід відмітити, що офіційний вінорельбін у тварин 2-ї групи зумовлював підвищення активності низькоспінової форми цитохрому Р450 у редокс-циклі системи детоксикації клітин печінки (g -фактор 2,25), рівня флавоубісеміхінонів в ЕТЛ мітохондрій гепатоцитів (g -фактор 2,00) та активності FeS-білка N2 типу в НАДН-убіхіноноксидоредуктазному комплексі ЕТЛ (g -фактор 1,94). У тварин-пухлиноносців 3-ї та 4-ї груп після комбінованого лікування з використанням нанокмплексу зазначені показники були нижчими. Якщо виходити з того, що досліджені показники відображають ступінь зміни оксидативного стресу [28], то можна припустити, що вплив вінорельбіну з НЧ оксиду заліза і локального електромагнітного випромінювання на карциному легені Льюїс спричинив менший гепатотоксичний ефект у тварин, ніж офіційний вінорельбін.

ВИСНОВКИ

Комбінований вплив вінорельбіну з НЧ та локального електромагнітного випромінювання на карциному легені Льюїс ініціював більший коефіцієнт гальмування росту пухлини,

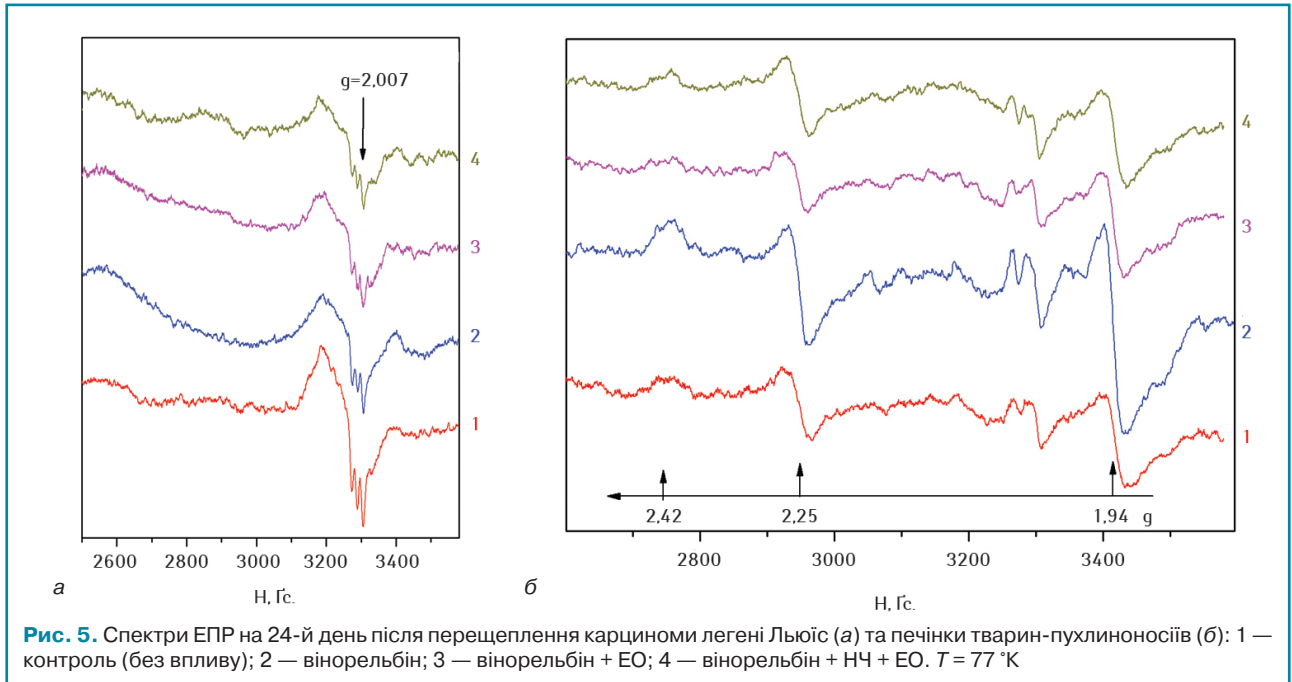


Рис. 5. Спектри ЕПР на 24-й день після перещеплення карциноми легені Льюїс (а) та печінки тварин-пухлиноносіїв (б): 1 — контроль (без впливу); 2 — вінорельбін; 3 — вінорельбін + ЕО; 4 — вінорельбін + НС + ЕО. $T = 77 \text{ K}$

індекс інгібування метастазування та некроз при слабковираженій експресії β -тубуліну, ніж офіційний вінорельбін. Гепатотоксичні ефекти за результатами зміни ЕПР-сигналу у печінці при комбінованому лікуванні були менш виражені, ніж під впливом офіційного вінорельбіну.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program of the U.S. National Cancer Institute, 18, 2008–2014.
2. Федоренко, З. П., Михайлович, Ю. Й., Гулак, Л. О., Горох, Є. Л., Рижов, А. Ю., Сумкіна, О. В., & Куценко, Л. Б. (2014). Рак в Україні, 2015–2016. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. *Бюлетень Національного канцер-реєстру України*, 18, 48.
3. Furuse, K., Fukuoka, M., & Kuba, M. (1996). Randomized study of vinorelbine versus vindezine in previously untreated stage IIIB or IV NSCLC. *Annals of Oncology*, 7(8), 815–820.
4. Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 253–265.
5. Chiu, W. H., Hai-Wen Chen, H., & Su, W. C. (2012). Oral vinorelbine: a better choice for concurrent chemoradiotherapy in stage III non-small cell lung cancer. *Journal of Solid Tumors*, 2(6), 4–15.
6. Hayakawa, A., Kawamoto, Y., Nakajima, H., Sakai, J., Takasawa, R., Nakashima, I. ... Tanuma S. (2008). Bid truncation mediated by caspases-3 and -9 in vinorelbine-induced apoptosis. *Apoptosis*, 13(4), 523–531.
7. Tuszyński, J. A., Carpenter, E. J., Huzil, J. T., Malinski, W., Luchko T., & Ludueña, R. F. (2007). The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *The International Journal of Developmental Biology*, 50, 341–358.
8. Taghi, M., Gholamhossein, R., & Saeed, R. Z. (2013). Effect of radio frequency waves of electromagnetic field on the tubulin. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, 7(3), 252–256.
9. Beebe, S. J., Sain, N. M., & Ren W. (2013). Induction of cell death mechanisms and apoptosis by nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs). *Cells*, 2(1), 136–162.
10. Muroski, M. E., Morshed, R. A., Cheng, Yu., Vemulkar, T., Mansell, R., Han, Y. ... Lesniak, M. S. (2016). Controlled payload release by magnetic field triggered neural stem cell destruction for malignant glioma treatment. *PLOS ONE*, 11: e0145129.
11. Johannsen, M., Thiesen, B., Wust P. & Jordan A. (2010). Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *International Journal of Hyperthermia*, 26, 790–795.
12. Orel, V., Shevchenko, A., Romanov A., Tselepi, M., Mitrelias, T., Barnes, C. H. ... Shchepotin, I. (2015). Magnetic properties and antitumor effect of nanocomplexes of iron oxide and doxorubicin. *Nanomedicine*, 11, 47–55.
13. Song Wang, Xing-Guo Mei, Nahum Goldberg, S., Muneeb Ahmed, Jung-Chieh Lee, Wei Gong ... Wei Yang. (2016). Does thermosensitive liposomal vinorelbine improve end-point survival after percutaneous radiofrequency ablation of liver tumors in a mouse model? *Radiology*, 279(3), 762–772.
14. Thiesen B., & Jordan A. (2008). Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*, 24, 467–474.
15. Yamada T., Egashira N., Takahisa M., Yano T., Yamauchi Y., Watanabe H., & Oishi R. (2010). Role of oxidative stress in vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(1), 120–127.
16. Orel, V. E., Tselepi, M., Mitrelias, T., Rykhalskiy, A., Romanov, A., Orel, V. B. ... Barnes, C. H. W. (2018). Nanomagnetic modulation of tumor redox state. *Nanomedicine*, 26, 1249–1256.
17. Matsuzaki, T., & Yokokura, T. (1987). Inhibition of tumor metastasis of Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mice by intrapleural administration of *Lactobacillus casei*. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 25, 100–104.

18. Gorelik, E., Segal, S., & Feldman, M. (1980). Control of lung metastasis progression in mice: role of growth kinetics of 3LL Lewis lung carcinoma and host immune reactivity. *Journal of the National Cancer Institute*, 33(3), 1257–1264.
19. Ritter, U., Scharff, P., & Prylutska, S. V. (2011). Pristine C₆₀ fullerene S inhibit the rate of tumor growth and metastasis. *Experimental Oncology*, 33(3), 162–164.
20. Эмануэль, Н. М. (1977). *Кинетика экспериментальных опухолевых процессов*. Москва: Наука, 419 с.
21. Ramalho R. T., Aydos R. D., Schetter I., & Cassino, P. C. (2014). Histopathological evaluation of tumor necrosis and volume after cyanogenic chemotherapy. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 29(2), 38–42.
22. Coffey, D. S. (1998). Self-organization, complexity and chaos: the new biology for medicine. *Nature Medicine*, 4(8), 882–885.
23. Lebok, P., Öztürk, M., Heilenkötter, U., Jaenicke, F., Müller, V., Paluchowski P. ... Quaas, A. (2016). High levels of class III β -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer. *Oncology Letters*, 11(3), 1987–1994.
24. Santelices, I. B., Friesen, D. E., Bell, C., Hough, C. M., Xiao, J., Kalra, A. ... Tuszyński, J. A. (2017). Response to alternating electric fields of tubulin dimers and microtubule ensembles in electrolytic solutions. *Scientific Reports*, 7(1), 9594.
25. Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 253–265.
26. Tuszyński, J. A., Brown, J. A., Crawford, E., Carpenter, E. J. M., Nip, L. A., Dixon, J. M., & Sataric, M. V. (2005). Molecular dynamics simulations of tubulin structure and calculations of electrostatic properties of microtubules. *Mathematical and Computer Modelling*, 41(10), 1055–1070.
27. Abdalla, E., Maroufi, B., Melgar, B. C., & Sedra, M. B. (2001). Information transport by sine-Gordon solitons in microtubules. *Physica A, Statistical Mechanics and its Applications*, 301(1–4), 169–173.
28. Kopáni, M., Celec, P., Danisovic, L., Michalka, P., & Biró, C. (2006) Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica Chimica Acta*, 364(1–2), 61–66.

Комбинированное влияние вінорельбіна с наночастицами оксида железа и электромагнитного излучения на карциному легкого Льюїс

В.Э. Орел¹, Л.А. Сивак¹, М.С. Кретевиц¹, О.И. Дасюкевич¹, А.Ю. Рыхальский¹, И.В. Орел¹, А.П. Бурлака², С.Н. Лукун²

¹Национальный институт рака, Киев
²Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

Резюме. Цель. Изучение возможности повышения эффективности противоопухолевой химиотерапии вінорельбином при комбинированном воздействии наночастиц оксида железа и электромагнитного излучения на животных с карциномой легкого Льюїс. **Объект и методы.** Исследование проводили на 40 самцах мышей линии C57Bl/6 массой тела 18–20 г. Использовали наночастицы Fe₃O₄ (Sigma-Aldrich) диаметром <50 нм и вінорельбин. Локализованное электромагнитное облучение (ЭО) проводили с помощью аппарата «Магнитер» (Радмир, Украина) с выходной мощностью 75 Вт. Длительность сеанса ЭО составляла 15 мин. Гистологическое типирование новообразований проводили с использованием рутинной окраски гематоксилином и эозином, а также иммуно-

ногистохимического исследования. Для исследования редокс-состояния опухоли и печени подопытных животных изучали спектры электронного парамагнитного резонанса, которые регистрировали на спектрометре REI307. **Результаты.** Комплекс винорельбина и наночастиц с ЭО инициировал на 16% больший противоопухолевый эффект и в 3,5 раза больший индекс ингибирования метастазов, чем официальный препарат. Результаты гистологических исследований показали, что использование винорельбина приводило к увеличению некроза опухолей на 34% по сравнению с контрольной группой. Комбинированное действие винорельбина с наночастицами увеличивало некроз карциномы легкого Льюиса до 44% по сравнению с контрольной группой. **Выводы.** Комбинированное действие винорельбина с наночастицами и локальным электромагнитным излучением на карциному легкого Льюиса инициировало больший коэффициент торможения роста опухоли, индекс ингибирования метастазов и некроз при слабовыраженной экспрессии бета-тубулина, чем официальный винорельбин. Гепатотоксические эффекты при комбинированном лечении были менее выраженными по сравнению с действием официального винорельбина.

Ключевые слова: винорельбин; наночастицы; карцинома легкого Льюиса; метастазы; β -тубулин; умеренная гипертермия; электромагнитное излучение.

Combined effect of the vinorelbine with iron oxide nanoparticles and electromagnetic radiation on the Lewis lung carcinoma

V.E. Orel¹, L.A. Syvak¹, M.S. Krotevych¹, O.Y. Dasiukevych¹, O.Y. Rykhalskiy¹, I.V. Orel¹, A.P. Burlaka², S.M. Lukin²

¹National Cancer Institute, Kyiv

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

Summary. Aim. The study of the possibility to increase the effectiveness of antitumor chemotherapy with vinorelbine during the combined effect of the iron oxide nanoparticles and electromagnetic radiation on the animals with Lewis lung carcinoma. **Materials and methods.** The study was made on 40 male C57Bl/6 mice with body

mass 18–20 g. Fe_3O_4 (Sigma-Aldrich) nanoparticles with diameter <50 nm and vinorelbine were used as parts of the antitumor drug. The apparatus «Magnetotherm» (Radmir, Ukraine) performed local electromagnetic irradiation (EI) of the tumor. The duration of the EI session was 15 min. Histologic typing of tumors was provided using the routine coloration with hematoxylin and eosin and immunohistochemical research. To study the redox state of tumors and liver, electron paramagnetic resonance spectra were studied, which were recorded on a computerized spectrometer REI307. **Results.** The complex of vinorelbine and nanoparticles with EI had a 16% greater antitumor effect, and up to 3.5 times higher metastatic inhibition index than the official drug. The results of histological studies indicate that the effect of official vinorelbine induced a tumors necrosis increase by 34% in comparison with the control group. The combined effect of vinorelbine with nanoparticles increased necrosis of the Lewis lung carcinoma to 44% in comparison with the control group. **Conclusions.** The combined effect of vinorelbine with nanoparticles and local electromagnetic radiation on the Lewis lung carcinoma initiated a higher tumor growth inhibition, a metastatic inhibition index and necrosis with a mild expression of tubulin beta than the official vinorelbine. Hepatotoxic effects in combined therapy were less pronounced than under the influence of official vinorelbine.

Key words: vinorelbine; nanoparticles; Lewis lung carcinoma; metastases; β -tubulin; moderate hyperthermia; electromagnetic radiation.

Адреса:

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

Correspondence:

Orel Valerii
33/43 Lomonosova Str., Kyiv 03022
National Cancer Institute
Tel.: (044) 257-60-68
E-mail: valeriorel@gmail.com