

ДОСЛІДЖЕННЯ МАГНІТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮІС І ПРОТИПУХЛИННОГО МАГНІТНОГО НАНОКОМПЛЕКСУ

Орел В.Е.¹, Шевченко А.Д.², Романов А.В.¹, Бурлака А.П.³,
Лукін С.М.^{3,4}, Сидорик Є.П.³, Венгер Є.Ф.⁴, Щепотін І.Б.¹

¹Національний інститут раку МОЗ України, Київ

²Інститут металофізики ім. Г.В. Курдюмова НАН України, Київ

³Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

⁴Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України, Київ

В теперішній час значні зусилля фахівців різних спеціальностей зосередженні на розробці базових основ інтегральних технологій магнітної візуалізації цифрових медичних зображень та нанотерапії [20]. Найбільш поширене використання протипухлинних магнітних наноконструкцій (МК) на основі синтезу біосумісних багатофункціональних наночастинок. Вони поєднуються з цитостатичними препаратами і вводяться пацієнтам через кровоносну систему. Наночастинки мають додаткові переваги, в порівнянні з традиційним прийомом препаратів. Це обумовлено їх здатністю інтегруватися з різноманітними речовинами за рахунок високої питомої поверхні. Дистанційно керовані за допомогою магнітного поля супермагнітні наночастинки, такі як наночастинки магнетиту (Fe_3O_4), об'єднані з цитостатичним препаратом можуть бути направлені в контрольовані та заздалегідь заплановані патологічні зони для оптимізації терапевтичної ефективності. Крім того, наночастинки оксиду заліза можуть бути використані в якості гіпертермічних агентів з метою підвищення ефективності променевої терапії [19].

Розробники сучасних нанотехнологій прагнуть створити методи, які мінімізують пошкодження здорових тканин та забезпечують при цьому максимальну доставку магнітокерованих магнітоконтрастних агентів безпосередньо до злоякісної пухлини. Щоб обмежити неспецифічне зв'язування наночастинок були розроблені наноконструкції, які мають спорідненість до пухлини-мішені через пасивний чи активний транспорт, а, у разі магнітних наночастинок, за рахунок їх магнітної орієнтації. Однак, лише 10-15% наночастинок потрапляють до пухлини [15]. Не менш проблемне завдання — це зображення розподілу магнітних наночастинок в пухлині. Це пов'язане з тим, що сучасні біомагнітні СКВІД-магнітометри та МРТ поки що не володіють достатньою точністю та роздільною здатністю для якісної візуалізації магнітних наночастинок в пухлинних тканинах [17].

Добре відомо також, що залізо володіє магнітними властивостями та знаходиться в ор-

ганізмі людини в залізовмісних білках еритроцитів — гемоглобіні, глобулярному білковому комплексі феритині, магнетиті (Fe_3O_4) та/або магеміті ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [6]. Порушення накопичування заліза та залізовмісних білків зареєстровано в різних злоякісних пухлинах [18]. Так, концентрація феримагнітних частинок, що містяться в менінгіомі головного мозку, на порядок вища, ніж у гіпокампі здорової людини. Взагалі, розподіл заліза в мозку людини неоднорідний. Тим не менш, швидкість утворення магнетиту та/або магеміту виявляється вищою в пухлинній тканині. Хоча ці пухлини добре забезпечуються кров'ю, невідомо чи грає кровопостачання якусь роль в утворенні у них високої концентрації заліза [11]. Магнітні наноструктури візуалізуються і в пухлинних клітинах карциноми Ерліха [7]. Багато пухлин мають високу внутрішню концентрацію глобулярного білкового комплексу — феритину [12]. Проте магнітні властивості не є специфічними феноменом лише для злоякісних пухлин. Так, виявлено залишкову намагніченість в тканинах шлунку здорової людини та хворих на рак шлунку, а також в злоякісних новоутвореннях товстої кишки і нирки. Незважаючи на наявність та біологічне походження, також мало що відомо про розподіл або метаболічні функції феромагнітних мінералів в тканинах тварин при експериментальному злоякісному процесі. Відомо, що оксиди заліза можуть накопичуватись в карциномі легені Льюїс, яка виникла спонтанно як рак легені миші лінії С57BL/6. Більшість з феромагнітних кристалів в карциномі легені Льюїс мають коерцитивну силу від 20 до 30 мТл. Контрольні зразки м'язової і сполучної тканин від нормальних тварин С57BL/6 мали дуже слабку коерцитивну силу 32 пТ [13].

Раніше в наших роботах було показано, що для карциноми легені Льюїс притаманні властивості м'якого феромагнетика, а для м'язової тканини задніх кінцівок нормальних мишей — діаманетика. Офіційний протипухлинний препарат доксорубіцин — діаманетик, механомагнітохімічно оброблений доксорубіцин (ДР) — парамагнетик, а механомагнітохімічно синтезований МК, до складу

якого входять магнетит та ДР — м'який феромагнетик [3]. Однак, ці результати досліджень магнітних властивостей є пілотними, в них не були наведені магнітні гістерезисні характеристики та спектри електронного парамагнітного резонансу.

Виходячи з того, що відомості про магнітні властивості важливі для подальшого впровадження в клінічну практику променевої діагностики, методів магнітної візуалізації цифрових медичних зображень та магнітної нанотерапії, метою даної роботи було проведення порівняльного дослідження магнітних властивостей карциноми легені Льюїс та оточуючих її тканин, а також МК і ДР.

Матеріали та методи

Трансплантована карцинома легені Льюїс. Дослідження було проведено на 10 мишах лінії С57BL/6 розводки виварію Національного інституту раку масою (20 ± 2) г з перещепленою карциномою легені Льюїс. Трансплантований штамп карциноми легені Льюїс отримано у клітинному банку ліній з тканин тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України. Трансплантацію пухлинних клітин карциноми легені Льюїс здійснювали введенням мишам в праве стегно суспензії клітин $2 \cdot 10^5$ клітин на тварину в об'ємі 0,2 мл в середовищі 199. Пухлину та оточуючі її м'язові і сполучні тканини були вилучені хірургічним шляхом з правої задньої кінцівки на 14 добу після перещеплення. Досліджували ліофілізовані тканини.

Тварини утримувались в однакових умовах на збалансованому харчуванні згідно з санітарно-гігієнічними нормами та вимогами GLP. Всі експериментальні дослідження виконували у повній відповідності з "Загальними етичними принципами експериментів на тваринах" (Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985).

Магнітний наноконкомплекс. МК був синтезований на основі наночасток оксиду заліза Fe_3O_4 з KCl, діаметром 20 — 40 нм, отриманих з застосуванням технології електронно-променевого випаровування та конденсації у вакуумі неорганічних матеріалів [2] та ДР виробництва Пфайзер Італія С.р.л., Італія. В роботі досліджували механомагнітохімічно оброблений ДР та МК, отримані з використанням механомагнітохімічної технології [4].

Магнітометрія. Магнітні характеристики зразків ліофілізованих тканин та препаратів отримані методом магнітометрії на вібраційному магнітометрі "Vibrating Magnetometer 7404 VSM" (фірма "Lake Shore Cryotronics, Inc.", США).

Радіоспектроскопія. Спектри електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) реєстрували на модернізованому спектрометрі марки PE1307 (ЗЕПС АН) за температури рідкого азоту (77 К) в циліндричному резонаторі з модою Н011, на частоті близько 9,15 ГГц. Потужність надвисокочастотного випромінювання складала 40 мВт. Використовували модуляцію магнітного поля частотою 100 кГц. Пробу розміщували у кварцовому дьюарі з

внутрішнім діаметром 4,5 мм. Об'єм проби складав 500 мл. В якості стандарту використовували Al_2O_3 з іонами Cr^{3+} .

Результати та їх обговорення

Магнітометрія. На рис. 1 наведено петлі гістерезису для МК, а на рис. 2 — для карциноми легені Льюїс. Аналізуючи ці дані слід відзначити, що МК характеризувався суттєво вищим магнітним моментом насичення mS , ніж злоякісна пухлина. Якщо для МК $mS = 11.781$ емо/г, то для пухлини $mS = + 0,187$ емо/г. Досліджені зразки МК мали властивості м'якого феромагнетика на відміну від офіційного ДР та механомагнітохімічно оброб-

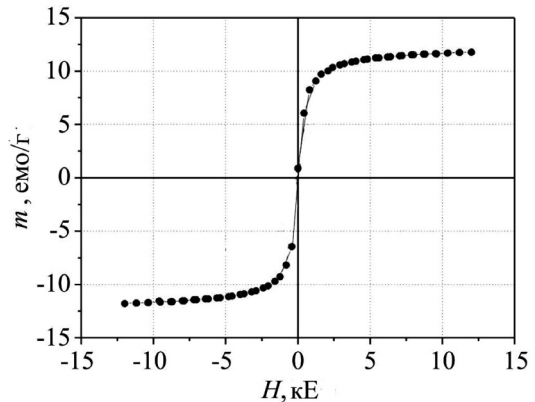


Рис. 1. Петлі гістерезису МК при 300 К. Н — напруженість магнітного поля.

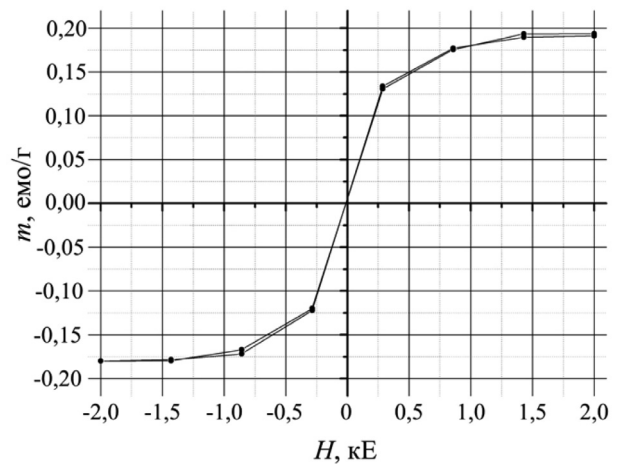


Рис. 2. Петлі гістерезису карциноми легені Льюїс при 300 К. Н — напруженість магнітного поля.

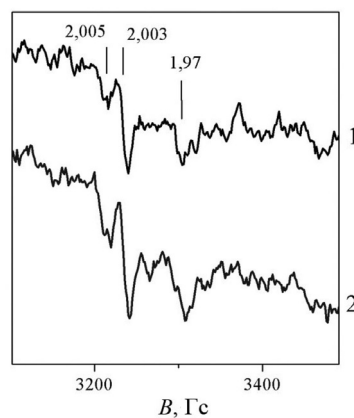


Рис. 3. Спектри ЕПР ДР: 1 — офіційний препарат, 2 — після механомагнітохімічної обробки.

Таблиця 1.
Концентрація парамагнітних центрів в досліджених зразках (С, мг⁻¹).

№	Зразки	g-фактор	Концентрація парамагнітних центрів
1	Офіційний ДР	2,003	$8 \cdot 10^{13}$
2	Механомагнітохімічно оброблений ДР	2,003	10^{14}
3	МК	2,64	10^{18}
4	Карцинома легені Льюїс	2,03	$1 \cdot 10^{15}$
5	Оточуючі тканини карциноми легені Льюїс	2,03	$3 \cdot 10^{14}$

леного препарату. Останні, згідно [3], мали відповідно властивості діаманетика ($m = -0,200$ емо/г) та парамагнетика ($m = + 0, 068$ емо/г при $H = 3000$ Е).

Радіоспектроскопія. Спектри ЕПР досліджених зразків показані на рис. 3-5, а концентрації в них парамагнітних центрів представлені в таблиці 1. Якісних змін в спектрах ЕПР зразків ДР не спостерігалось. Отримані дані свідчать, що концентрація парамагнітних центрів з $g = 2,003$ в ДР, який набув властивості парамагнетика під впливом механомагнітохімічної обробки, збільшилась на 25% в порівнянні з офіційним ДР, що мав властивості діаманетика. Максимальна концентрація парамагнітних центрів спостерігається в пробах МК (рис. 4). При цьому g -фактор спектра ЕПР підвищився до 2,64. Відомо, що для звичайних наночастинок Fe_3O_4 характерні ЕПР сигнали з g -факторами 2,08 і 2,19 [14]. Карцинома легені Льюїс мала в три рази вищу концентрацію парамагнітних центрів, ніж оточуючі її тканини (рис. 5). При цьому були збережені усі відомі компоненти спектра ЕПР біологічних об'єктів. g -фактори в ЕПР спектрах досліджених зразків наведені згідно [1, 8]: 1,88 — FeS-білок S-3 електронтранспортного ланцюга сукценатдегідрогеназного комплексу мітохондрій; 1,94 — FeS-білок N2 електронтранспортного ланцюга NAD • Н -убіхіноноксидоредуктазного комплексу мітохондрій; 2,00 — убісеміхінон; 2,03 — комплекси NO-FeS-білки N2 електронтранспортного ланцюга мітохондрій; 2,07 — компонента триплетного сигналу ЕПР гемових та негемових білків.

Аналіз отриманих даних свідчить, що ми повинні враховувати не лише магнітні властивості наночастинок Fe_3O_4 [10] в МК, але і карциноми легені Льюїс та органічних протипухлинних препаратів після механомагнітохімічного синтезу при лікуванні злоякісних пухлин з використанням магнітних наночастинок і променевому опроміненні пухлин.

В майбутньому ми плануємо вивчити нелінійну динаміку магнітних властивостей компонентів МК в

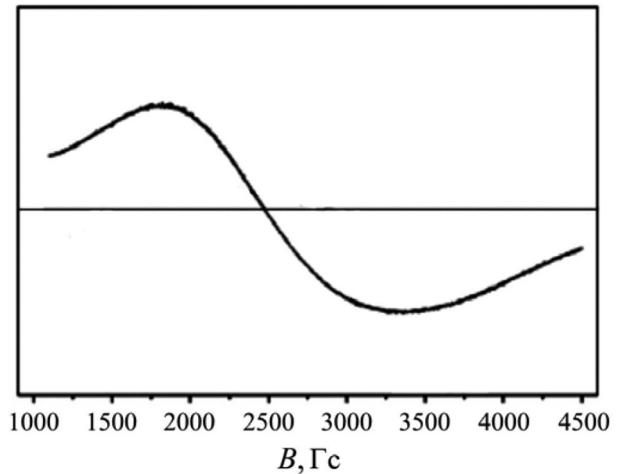


Рис. 4. Спектр ЕПР механомагнітохімічно синтезованого МК.

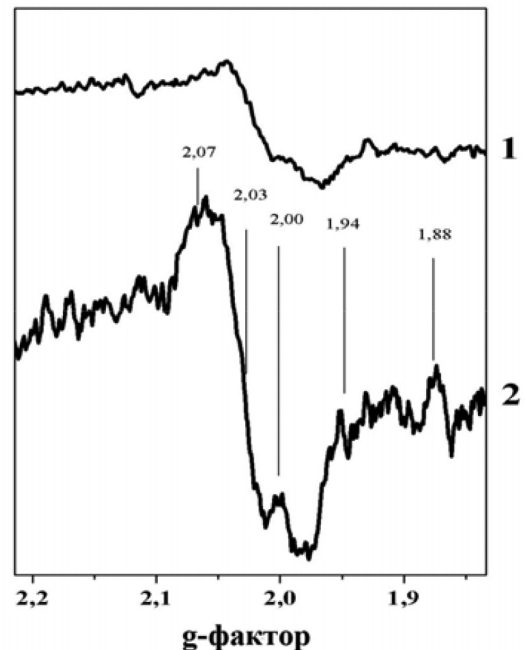


Рис. 5. Спектри ЕПР карциноми легені Льюїс (2) та оточуючих її тканин (1) при $T = 77K$.

карциномі легені Льюїс та її оточення в різний час після перещеплення пухлини за допомогою СКВІД-магнітометрів та МРТ на основі робіт [5, 16]. Це сприятиме збільшенню нашого розуміння можливих особливостей магнітних властивостей МК в пухлині та її мікрооточенні. Враховуючи, що пухлина досягає тільки 10-15% МК від загальної кількості препарату, який вводиться пацієнту [9] отримана інформація могла б підвищити ефективність технологій магнітної діагностики та нанотерапії пухлин.

Висновки

1. Карцинома легені Льюїс на 14 день після щеплення, будучи м'яким феромагнетиком, мала в 3 рази вищу концентрацію парамагнітних центрів у порівнянні з оточуючими її діаманітними тканинами.
2. Антрацикліновий протипухлинний антибіотик доксорубіцин після механомагнітохімічного

впливу набував властивості парамагнетика та, на відміну від офіційного діамагнітного препарату, мав майже на 25% більше парамагнітних центрів з g -фактором 2,003 без змін спектру ЕПР.

Література

1. Блюменфельд Л.А. Проблемы биологической физики. — М.: Наука, 1977. — 336 с.
2. Мовчан Б.А. Электронно-лучевая нанотехнология и новые материалы в медицине — первые шаги // Вісн. фармакол. і фармації. — 2007. — № 12. — С. 5-13.
3. Орел В.Е., Шевченко А.Д., Дзятковська Н.М., Ніколов М.О., Романов А.В., Бурлака А. П., Лукін С. М., Щепотін І.Б. Дослідження впливу радіочастотної гіпертермії та магніточутливого наноконструкту на карциному легенеї Льюїс // Променева діагностика, Променева терапія. — № 3-4. — 2011. — С. 43-47.
4. Орел В.Е., Шевченко А.Д., Мельник Ю.Г. та ін. Фізико-хімічні характеристики магніточутливого наноконструкту, отриманого з використанням механомагнітохімічної технології сухого синтезу // Металлофізика і новіші технології. — 2010. — Т. 32, № 9. — С. 1157-1167.
5. Рижченко Т., Будник М., Короновська К. Дослідження магнітних наноматеріалів на експериментальних моделях *in vivo* та *in vitro* // Електроніка і зв'язок. — № 4-5. — 2009. — С. 63-67.
6. Чехун В.Ф., Горобець С.В., Горобець О.Ю. Магнітовпорядковані сполуки ендогенного заліза і проблема впливу постійних магнітних полів на біосистеми // Біофізичний вісник. — Т. 25, № 2. — 2010. — С. 123-130.
7. Чехун В., Горобець С., Горобець О., Дем'яненко І. Магнітні наноструктури в пухлинних клітинах. Застосування методів скануючої зондової мікроскопії для дослідження структурної організації магніточутливої фази в пухлинних клітинах карциноми Ерліха // Вісник Національної Академії Наук. — № 11. — 2011. — С. 13-20.
8. Эмануэль Н.М., Кавецкий Р.Е., Тарусов Б.Н., Сидорик Е.П. Биофизика рака. — Киев: Наукова думка, 1976. — 296 с.
9. Amiji M.M. Nanotechnology for Cancer Therapy. Boca Raton: CRC Press, 2007. — 443 p.
10. Arruebo M., Fernandez-Pacheco R., Ibarra M.R. Magnetic nanoparticles for drug delivery // J. Nanotoday. — 2007. — V. 2, N. 3. — P. 22-32.
11. Brem F., Hirt A.M., Winklhofer M. et al. Magnetic iron compounds in the human brain a comparison of tumor and hippocampal tissue // Journal of the Royal Society Interface. — N. 3. — 2006. — P. 833-841.
12. Dorner M.H., Silverstone A., Nishiya K., de Sostoa A., Munn G., de Sousa M. Ferritin synthesis by human T lymphocytes // Science. — V. 209. — 1980. — P. 1019-1021.
13. Kirschvink J.L., Tabrah F.L., Batkin S. Ferromagnetism in two mouse tumours // Journal of Experimental Biology. — V. 101. — 1982. — P. 321-326.
14. Koseoglu Y., Yildiz F., Kim D.K., Muhammed M. ESR studies on superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles // Phys. Stat. Sol. — V. C1. — 2004. — P. 3511-3515.
15. Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine // Appl. Phys. — V. D36. — 2003. — P. R167-R181.
16. Primin M., Nedayvoda I. Algorithms for the magnetostatic inverse problem solution: new approaches and some results // Int. J. on Applied Electromagnetics in Mechanics. — V. 29, N. 2. — 2009. — P. 65-81.
17. Richter H., Kettering M., Wiekhorst F., Steinhoff U., Eberbeck D., Hilger I., Trahms L. Localization and Quantification of Magnetic Nanoparticles by Multichannel

Magnetorelaxometry for *in vivo* Hyperthermia Studies in Carcinoma Models // World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7 — 12, 2009. Munich, Germany, Springer, Heidelberg, IFMBE Proceedings. — 2009. — V. 25 — P. 302-305.

18. Romeu A., L A., Alemany M. Combined effects of pregnancy and Lewis lung carcinoma bearing upon essential metal tissue content in inbred mice // Oncology. — V. 44. — 1987. — P. 319-326.

19. Thiesen B., Jordan A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia // Int. J. Hyperthermia. — V. 24. — 2008. — P. 467-474.

20. Wiekhorst F., Jurgons R., Eberbeck D. et al. Quantification of magnetic nanoparticles by magnetorelaxometry and comparison to histology after magnetic drug targeting // J Nanosci Nanotech. — V. 6. — 2006. — P. 222-225.

РЕЗЮМЕ. Исследованы эндогенные магнитные свойства карциномы легких Льюис, механомагнитохимически обработанного антрациклинового противоопухолевого антибиотика доксорубина (ДР) и механомагнитохимически синтезированного противоопухолевого магниточувствительного комплекса (МК), в состав которого входили магнитные наночастицы Fe_3O_4 с КСІ и ДР. Магнитные свойства изучались методами вибрационной магнитометрии и спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Карцинома легкого Льюис на 14 день после перерыва обладала свойствами мягкого ферромагнетика и имела в 3 раза больше концентрацию парамагнитных центров, чем окружающие опухоль ткани мышей C57Bl/6, обладающих диамагнитными свойствами. Антрациклиновый противоопухолевый антибиотик доксорубин после механомагнитохимического влияния приобретал свойства парамагнетика и, в отличие от официального диамагнитного препарата, имел на 25% больше парамагнитных центров с g фактором 2,003 без изменений спектра ЭПР. Полученные данные позволяют улучшить наше понимание возможных особенностей магнитных взаимодействий между компонентами МК со злокачественной опухолью и ее микроокружением, что может повысить эффективность целевой доставки препаратов в опухоль.

Ключевые слова: карцинома легкого Льюис, доксорубин, магнитные наночастицы, магнитные свойства.

SUMMARY. In this study we have examined endogenous magnetic characteristics of Lewis lung carcinoma, mechano-magneto-chemical treated anthracycline antitumor antibiotic doxorubicin (DR) and mechano-magneto-chemical synthesized magneto-sensitive antitumor complex (MC) consist of magnetic nanoparticles Fe_3O_4 with KCl and DR. Magnetic properties were studied by the method of vibrating magnetometry and electron spin resonance spectroscopy (ESR). Lewis lung carcinoma on 14 days after transplantation had the properties of soft ferromagnet, and a concentration of paramagnetic centers was in 3 times greater, in contrast to environment tissues of the tumor tissue of C57Bl/6 mice, which was diamagnetic. Anthracycline antitumor antibiotic doxorubicin after mechano-magneto-chemical treatment was paramagnetic in contrast to conventional drug which was diamagnetic and had on 25% more paramagnetic centers with g -factor 2.003 and unchanged ESR spectrum. This will advance our understanding of possible singularities in magnetic properties during interaction MC components with tumor and tumor microenvironment, which is able to increase the efficiency of drug delivery into tumor.

Key words: Lewis lung carcinoma, doxorubicin, magnetic nanoparticles, magnetic properties.