

В.Е. Орел, Н.М. Дзятковська,
М.Й. Данко, Ю.Р. Мединець,
В.А. Зінченко, С.В. Андрійченко,
Ю.М. Білокінь, А.В. Романов,
О.Ю. Придатко

Інститут онкології
АМН України,
м. Київ,

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

Ефект впливу 40 МГц електромагнітного опромінювання та механічно активованого доксорубіцину на тварин з карциносаркомою Уокер-256

The effect of 40 MHz electromagnetic irradiation
and mechanically activated doxorubicin on animals
with carcinosarcoma Walker-256

Цель работы: Изучить влияние 40 МГц электромагнитного облучения (ЭМО) и механически активированного (МА) доксорубицина (ДР) на животных с карциносаркомой Уокер-256.

Материалы и методы: Исследования проведены на 60 неинбредных крысах-самках массой 90–100 г. Локальное 20-минутное 40 МГц ЭМО животных осуществляли рамочным излучателем при плотности поглощенной мощности 5,2 мкВт/см². Механическую активацию твердой формы препарата проводили в микровибромельнице с интенсивностью подвода механической энергии 20 Вт/г в течение 5 мин. Препарат вводили внутривентриально в дозе 1 мг/кг на 3, 5-е и 7-е сутки, а также в дозе 3 мг/кг на 11-е и 13-е сутки после перевивки опухоли. Изучали изменение объема опухоли, содержание МДА, активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в опухоли, хемилюминесценцию (ХЛ) сыворотки и механоэмиссию (МЭ) крови. Проведены цитологические исследования опухоли.

Результаты: Показано, что в группе животных, которым проводили ЭМО, наблюдалось увеличение объема опухоли. Комбинированное действие ЭМО и ДР имело более высокую противоопухолевую активность при использовании МА препарата. В клетках опухоли было много некротических участков, отмечалось увеличение деструкции и гетерогенности клеток. После комбинированного действия ЭМО и МА ДР наблюдалось уменьшение содержания МДА, активности каталазы и СОД в опухоли, а также ХЛ сыворотки и показателя хаоса МЭ крови животных.

Выводы: Комбинированное действие 40 МГц ЭМО и МА ДР при физиологической температуре инициирует наибольшее торможение роста, наименьший митотический индекс, а также изменяет интенсивность пероксидных окислительных процессов в карциносаркоме Уокер-256 и крови животных-опухоленосителей по сравнению с монотерапией официальным ДР, 40 МГц ЭМО и их комбинированным действием.

Ключевые слова: электромагнитное облучение, механическая активация, доксорубицин, карциносаркома Уокер-256, пероксидное окисление.

Objective: To study the influence of 40 MHz electromagnetic irradiation (EMI) and mechanically activated (MA) doxorubicin (DR) on animals with carcinosarcoma Walker-256.

Material and Methods: The investigation was carried out on 60 mongrel male rats weighing 90-100g. Local 20 min 40 MHz EMI of animals was carried out by frame at intensity of absorbed energy of 5.2 mW/cm². Mechanical activation of the solid state of the drug was performed in the microvibromill with mechanical energy 20 W/g for 5 min. The drug was infused intraperitoneally at a dose of 1 mg/kg on the 3rd, 5th, 7th days and 3 mg/kg on the 11th and 13th days after of the tumor transplantation. The changes in the tumor volume, malonic dialdehyde (MDA) level, catalase and superoxide dismutase (SOD) activity in the tumor, serum chemiluminescence (CL) and mechanoemission (ME) of blood were studied. This was accompanied by cytologic investigations of the tumor.

Results: It was shown that in the group of animals exposed to EMI, increase of the tumor volume occurred. Combination of EMI with MA drug had more pronounced anticancer activity. In malignant cells, numerous necrosis parts, increase of destruction and heterogenous cells were noted. After combined influence of EMI and MA DR MDA level, catalase and SOD activity in tumor, serum CL and ME in animal blood were decreased.

Conclusion: Combination of 40MHz EMI and MA DR at physiologic temperature initiates the greatest inhibition of the tumor growth, the lowest mitotic index and changes in the intensity of peroxide oxidation in carcinosarcoma Walker-256 and the blood of animals in comparison with monotherapy using officinal DR, 40MHz EMI and their combination action.

Key words: electromagnetic irradiation, mechanical activation, doxorubicin, carcinosarcoma Walker-256, peroxide oxidation.

Електромагнітне нейонізувальне випромінювання досить широко використовують у комбінованих схемах термохемо- і терморадіотерапії пухлин [1]. У раніше надрукованих працях показано, що застосування доксорубіцину (ДР) в умовах електромагнітної гіпертермії приводить до посилення протипухлинного ефекту препарату, який належить до групи та-

ких, що демонструють не лінійне, а граничне збільшення цитотоксичності зі зростанням температури. Один з фізико-хімічних механізмів цитотоксичної дії ДР зумовлений вільнорадикальним окиснюванням мембранних ліпідів клітин, що викликає їх руйнування. В результаті дії вільних радикалів порушується і структура ДНК. При гіпертермії в інтер-

валі температур 37–42 °С виявляється незначна зміна цитотоксичності, але коли температура перевищує 42–43 °С спостерігається яскраво виражений синергізм дії електромагнітної гіпертермії й антибіотика [2, 3]. Використання гіпертермії в медицині має ряд обмежень, зумовлених побічною дією високих температур [4]. Разом з тим нейонізувальне електромагнітне опромінювання впливає на поляризаційні ефекти, модифікуючи хеморезистентність злоякісних клітин до ДР і при фізіологічній температурі. Вважають, що це пов'язано з ушкодженням ДНК вільними радикалами [5].

Відомо, що механічний вплив на речовину може спричинити її перетворення, пов'язане з розривом і утворенням валентних кутів, іонів, вільних радикалів і виникненням слабкіших міжмолекулярних взаємодій [6]. Після м'якої механічної обробки ДР не було зафіксовано істотних змін у його УФ, ІК і ЯМР-спектрах, але спостерігалось збільшення кількості одно- і двовалентно заряджених іонів у розчині препарату [7, 8]. Комбінована дія 40 МГц електромагнітного опромінювання (ЕМО) і механічно активованого (МА) ДР при 37 °С ініціювала більшу загибель клітин карциноми грудної залози людини МСF7, ніж вплив ЕМО й офіціального (ОФ) препарату [9].

Метою даної роботи було вивчення ефекту впливу 40 МГц ЕМО і МА доксорубіцину на тварин з карциномсаркомою Уокер-256.

Методика дослідження

Для вивчення впливу ЕМО на протипухлинну активність МА ДР досліджували дію цього препарату на ріст карциномсаркоми Уокер-256 у тварин. Досліди проводили на 60 неінбредних щурах-самицях масою 90–100 г розведення віварію Інституту онкології АМН України. Трансплантацію пухлинних клітин здійснювали введенням 0,3 мл 30 %-вої суспензії. Тварин було поділено на 6 груп: 1-ша — контрольна без опромінювання та введення препарату; 2-га — ЕМО; 3-тя — введення ОФ ДР; 4-та — введення МА ДР; 5-та — ЕМО та введення ОФ ДР; 6-та — ЕМО та введення МА ДР. Кількість спостережень у кожній серії досліджень становила 10.

Для локального 20-хвилинного ЕМО тварин використовували розроблений Ю.Р. Мединцем апарат ДВЧ з рамковим випромінювачем діаметром 3 см. Частота випромінювання 40 МГц при значенні питомої поглинутої потужності 5,2 мкВт/см³. Електрична напруженість поля на відстані 5 см від центру площини рамки-випромінювача становила 200 В/м, магнітна напруженість у площині рамки — 72 А/м. Механічну активацію

твердої форми препарату проводили в мікрівібромліній ММVE-0,005 («Гефест», Росія) з інтенсивністю підведення механічної енергії 20 Вт/г протягом 5 хв. Препарат вводили внутріочеревинно в дозі 1мг/кг на 3, 5-ту і 7-му добу та в дозі 3 мг/кг на 11-ту й 13-ту добу після перещеплення пухлини. Одразу після введення ДР проводили ЕМО. Температура в пухлині не перевищувала 38,5–39,5 °С.

Виходячи з того, що протипухлинний механізм ДР частково зумовлений процесами пероксидного окиснювання (ПО), ми досліджували їх зміни в пухлинах і крові. Матеріали для дослідження — пухлини і кров — одержували при декапітації тварин під наркозом [10]. Дослідження вмісту малонового діальдегіду (МДА), активності антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази (СОД) та каталази в пухлинах проводили згідно з описаними в роботі методиками [11]. Хемолюмінесценцію (ХЛ) крові тварин, індуковану Н₂O₂, вимірювали на хемолюмінометрі ХЛМ1Ц-01(Україна). Вивчення електричної компоненти механоемісії (МЕ) крові проводили на приладі ТРА-3. Нелінійну динаміку (хаос) МЕ крові оцінювали за допомогою оригінального алгоритму розрахунку параметра S-розходження фазової траєкторії [12].

Об'єм пухлини вимірювали і розраховували згідно з працею [13]. Цитологічні дослідження, що спираються на вивчення кількісного показника мітотичної активності, проводили на 17-ту добу після перещеплення пухлини згідно з методикою, описаною в праці [14]. Отримані на скельцях відбитки клітин карциномсаркоми Уокер-256 фіксували в 96 %-вому етиловому спирті, потім забарвлювали гематоксилін-еозинном. При мікроскопічних дослідженнях оцінювали кількість незмінених клітин у 100 полях зору та клітин у стані поділу серед цих же клітин. Після цього розраховували відсоток клітин у стані поділу, тобто їх мітотичну активність, за допомогою мітотичного індексу (МІ).

Статистичну обробку результатів з використанням t-критерію Стьюдента виконували за допомогою комп'ютерної програми STATISTICA.

Результати та їх обговорення

Результати вивчення дії ЕМО та ДР при експериментальному пухлинному процесі на 17-ту добу після перещеплення карциномсаркоми Уокер-256 подані на рис. 1. Аналізуючи їх, слід зазначити, що в групі тварин, яким проводили ЕМО, збільшення об'єму пухлини досягло 31 % ($p < 0,01$). Введення ОФ ДР сприяло зменшенню об'єму пухлини порівняно з контролем на 47 % ($p < 0,01$), а МА ДР — на 57 % ($p < 0,01$); ЕМО та ДР гальмували ріст пухлини. Найвищу протипухлинну активність викликала комбінована дія ЕМО і МА ДР. Вони ініціювали гальмування зростання карциномсаркоми Уокер-256 на 64 % ($p < 0,01$). При цьому показник МІ був у 3,1 разу нижчий, ніж у контрольній групі, тобто найнижчий серед усіх досліджених груп.

На рис. 2 наведені типові мікрофотографії відбитків препаратів пухлин тварин. Аналізу-

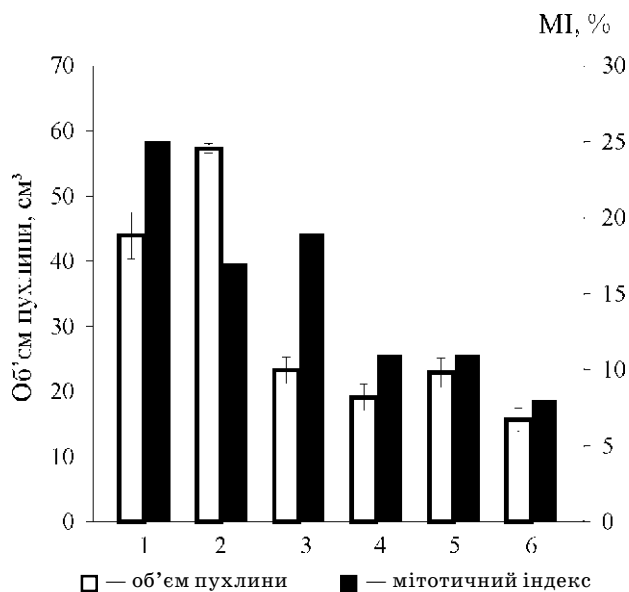


Рис. 1 — Вплив електромагнітного опромінювання та доxorубіцину на ріст карциносаркоми Уокер-256 і мітотичний індекс на 17-ту добу після перещеплення: 1 — контроль (без ДР і ЕМО); 2 — ЕМО; 3 — ОФ ДР; 4 — МА ДР; 5 — ЕМО + ОФ ДР; 6 — ЕМО + МА ДР

Fig. 1 — Influence of electromagnetic irradiation and doxorubicin on the growth of carcinosarcoma Walker-256 and mitotic index on the 17th day of transplantation: 1 — controls (without DR and EMI); 2 — EMI; 3 — official DR; 4 — MA DR; 5 — EMI + official DR; 6 — EMI + MA DR; □ — the volume of the tumor; ■ — mitotic index

ючи такі знімки карциносаркоми Уокер-256, слід зауважити, що в усіх препаратах, одержаних від щурів, яких піддавали впливу 40 МГц ЕМО та ДР, виявлено атипові зміни порівняно з пухлинами контрольної 1-ї групи тварин-пухлиноносіїв. У препаратах пухлини щурів,

яких тільки опромінювали, виявлено ділянки дегенеративно змінених клітин і мітозів. Найдеструктивніші зміни в клітинах карциносаркоми Уокер-256 справляла модифікувальна дія ЕМО після введення МА ДР. Спостерігали клітини з вакуолізованою цитоплазмою. Значну площу займав некроз, поруч із полями якого розташовувалися ділянки пікнозу, лізису та каріорексису клітин.

Аналіз зміни показників ПО, представлених у табл. 1, свідчить, що під впливом ЕМО та введення ДР у пухлинах тварин статистично вірогідно зменшувалася кількість МДА (в середньому на 62 %), найбільше зменшення якої (на 70 %) ($p < 0,01$) відбувалось у карциносаркомі Уокер-256 після ЕМО та введення МА ДР порівняно з контрольною групою тварин. Для каталази найменший показник був після введення МА ДР, а для СОД — після ЕМО та введення МА ДР, порівняно з контрольною групою тварин ці показники були меншими відповідно на 52 % ($p < 0,01$) і 49 % ($p < 0,01$). Величини ХЛ сироватки крові опромінених тварин-пухлиноносіїв майже не відрізнялись від таких у контрольній групі. Під впливом ДР та комбінованої дії препарату й 40 МГц ЕМО ХЛ сироватки крові знижувалася в середньому на 17 % порівняно з контрольною групою щурів. Максимальне зменшення цього показника (на 26 %)

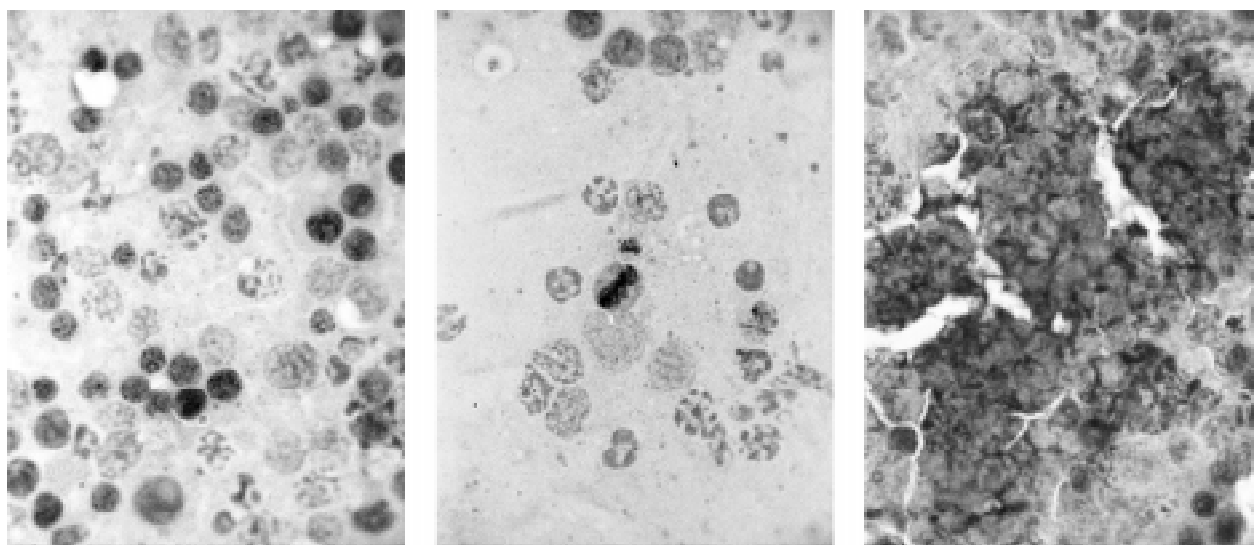


Рис. 2 — Мікрофотографії відбитків карциносаркоми Уокер-256 на 17-ту добу після перещеплення: а — контроль (без ЕМО та ДР); б — ЕМО; в — ЕМО + ДР. Забарвлення гематоксилін-еозином, $\times 400$

Fig. 2 — Microphotographs of carcinosarcoma Walker-256 on the 17th day after transplantation: а — controls (without DR and EMI); б — EMI; в — EMI + DR. Stained with hematoxylin and eosin, $\times 400$

Таблиця 1 — Вплив електромагнітного опромінювання та доксорубіцину на пероксидне окиснення карциносаркоми Уокер-256 та крові тварин-пухлиноносіїв (на 17-ту добу після перещеплення)
 Table 1 — Influence of electromagnetic irradiation and doxorubicin on peroxidation of carcinoma Walker-256 and blood in the animals with tumors (on the 17th day of transplantation)

Група тварин	Серія дослідів	Пухлина			Сироватка крові	Суцільна кров
		МДА, нмоль/1 мг білка	Каталаза, ммоль/хв 1 г білка	СОД, умов.од./1 мг білка	ХЛ, імп./5 хв	МЕ, параметр S, умов.од.
1	Контроль (без ДР і ЕМО)	257,9 ± 27,8	18,5 ± 1,8	17,2 ± 0,5	54318 ± 694	4286
2	ЕМО	100,4 ± 2,6* +	11,7 ± 1,3*	12,8 ± 0,5* +	54522 ± 949 +	3048
3	ОФ ДР	117,5 ± 2,8*	13,4 ± 0,3*	15,7 ± 0,4*	49868 ± 983*	3015
4	МА ДР	78,9 ± 3,9* +	8,9 ± 0,3* +	10,9 ± 0,1* +	42336 ± 702* +	4457
5	ЕМО+ОФ ДР	120,5 ± 5,9*	10,1 ± 1,3* +	9,9 ± 3,5	48202 ± 1109*	6922
6	ЕМО+МА ДР	78,5 ± 1,2* +	15,2 ± 0,4 +	8,7 ± 0,2* +	40370 ± 898* +	2262

Примітка. Різниця статистично вірогідна: * — порівняно з контролем; + — порівняно з тваринами, яким вводили ОФ ДР.

($p < 0,01$) порівняно з контрольною групою мало місце у тварин-пухлиноносіїв після комбінованого впливу ЕМО та МА ДР. У змінах параметра S МЕ крові простежували такі закономірності. Якщо після введення ОФ ДР S зменшувався на 29 %, то в експериментах з наступним ЕМО він істотно зростає порівняно з аналогічним показником контрольної групи. В експериментах з МА ДР все навпаки. Введення МА ДР ініціює підвищення S на 4 %, а наступне ЕМО викликає інгібування S на 47 % відповідно до аналогічно показника контрольної групи.

Проведені дослідження свідчать, що самостійне ЕМО тварин-пухлиноносіїв ініціює ріст карциносаркоми Уокер-256. Однак при комбінованій дії ЕМО і МА ДР спостерігали найбільше гальмування росту пухлини, найменший МІ, зменшення МДА, каталази, СОД в пухлині, а також ХЛ сироватки та показника хаосу МЕ крові тварин.

На даному етапі дослідження можна висловити лише суто попередні припущення про можливий механізм більш інтенсивного гальмування пухлинного росту карциносаркоми Уокер-256 в результаті комбінованої дії ЕМО і МА ДР. Можна припустити, що після введення МА препарату відбувається посилення ефекту взаємодії позитивно зарядженого МА антибіотика з негативно зарядженими клітинними мембранами пухлинних клітин. Механізм цього ефекту зумовлений гідрофоб-

ною й електростатичною дестабілізацією стеричних факторів в аміногрупах поверхні пухлинних клітин [15]. При цьому спостерігається зменшення в пухлині МДА, каталази й СОД, а в крові — ХЛ сироватки та показника хаосу МЕ. Як відомо, зміна динаміки антиоксидантної активності ліпідів пухлин має коливальний нелінійний характер у різних фазах росту пухлини, на який впливає і хемотерапія, проведена, зокрема, за допомогою ДР [16, 17]. Наступне ЕМО, можливо, надалі ініціювало нелінійний ефект деполаризації мембран пухлинних клітин, супроводжуваний зміною динаміки ПО. Визначна роль при цьому може бути відведена вільнорадикальним реакціям механохімічної природи [6]. Так, зниження параметра S МЕ крові характеризувало ефект придушення хаосу в нелінійній динаміці вільнорадикальних механохімічних процесів. Це очевидно впливало на посилення апоптозу і некрозу пухлини у тварин.

Описаний вище ефект більш інтенсивного гальмування росту карциносаркоми Уокер-256 в результаті комбінованої дії 40 МГц ЕМО і МА ДР при фізіологічній температурі може знайти практичне застосування в клінічній практиці.

ВИСНОВКИ

1. При фізіологічній температурі 40 МГц ЕМО та МА ДР викликають найбільше галь-

мування росту карциносаркоми Уокер-256 порівняно з монотерапією ОФ ДР, 40 МГ_ц ЕМО та їх комбінованою дією.

2. Комбінований вплив 40 МГ_ц ЕМО та МА ДР викликає найбільші деструктивні зміни в клітинах карциносаркоми Уокер-256, при цьому в пухлинних клітинах був найнижчий МІ.

3. Модифікувальна дія нейонізуючого 40 МГ_ц ЕМО на тварин-пухлиноносіїв з МА ДР спричиняє зміни в пероксидних окиснювальних процесах карциносаркоми Уокер-256 та крові тварин.

Література

1. Ярмоненко С.П., Коноплянников А.Г., Вайсон А.А. *Клиническая радиобиология*. — М.: Медицина, 1992. — 320 с.
2. Жаврид Э.А., Осинский С.П., Фрадкин С.З. *Гипертермия и гипергликемия в онкологии*. — К.: Наук. думка, 1987. — 256 с.
3. Hortobagyi G.N. // *Drugs*. — 1997. — Vol. 54, № 4. — P. 1–7.
4. Falk M.H., Issels R.D. // *Int J. Hyperthermia*. — 2001. — Vol. 17, № 1. — P. 1–18.
5. Hurata M., Kusuzaki K., Takeshita H. et al. // *Anticancer Res.* — 2001. — Vol. 21, № 1A. — P. 317–320.
6. Дубинская А.М. // *Успехи химии*. — 1999. — Т. 68, № 8. — С. 708–724.
7. Todor I.N., Orel V.E., Mikhaïlenko V.M., Danko M.I., Dzyatkovskaya N.N. // *Experiment. Oncol.* — 2002. — Vol. 24, № 3. — С. 234–236.
8. Орел В.Е., Дзятковська Н.М., Данко М.Й. // *Фармакол. журн.* — 2000. — № 2. — С. 75–78.
9. Орел В.Е., Дзятковська Н.М., Зінченко В.А. та ін. // *Фіз. жив.* — 2002. — Т. 10, № 1. — С. 89–95.
10. Chappell S.P., Friffith J.M., Henderson A.H., Lewis M.J. // *Brit. J. Pharm.* — 1985. — Vol. 85, Suppl. 85. — P. 266.
11. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. *Перекисное окисление и радиация*. — К.: Наук. думка, 1991. — 256 с.
12. Orel V.E., Romanov A.V., Dzyatkovskaya N.N., Mel'nik Yu. I. // *Med. Engin. and Phys.* — 2002. — Vol. 24, № 5. — P. 365–371.
13. Giuliani F.C., Kaplan N.O. // *Cancer Res.* — 1980. — Vol. 40. — P. 4682–4687.
14. Саков В.Л., Пинчук В.Г., Исакова Л.М. *Современные методы автоматизации цитологических исследований*. — К.: Наук. думка, 1988. — 216 с.
15. Janes K.A., Fresneau M.P., Marazuela A. et al. // *J. of Controlled Release*. — 2001. — Vol. 73. — P. 255–267.
16. Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина Е.М. и др. *Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте*. — М.: Наука, 1975. — 211 с.
17. Yee S.B., Pritsos C. // *Arch. of Biochem. and Biophys.* — 1997. — Vol. 347, № 2. — P. 235–241.

Дата надходження: 04.01.2003.

Адреса для листування:
Орел Валерій Еммануїлович,
Інститут онкології АМН України, Київ, 01022, Україна