

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2005

*Н. А. Брусенцов<sup>1,2</sup>, Л. Х. Комиссарова<sup>2</sup>, Т. Н. Брусенцова<sup>3</sup>,  
Ф. С. Байбуртский<sup>2</sup>, А. Ф. Миронов<sup>4</sup>, А. В. Любешкин<sup>4</sup>,  
Е. Ю. Филинова<sup>1</sup>, Т. Г. Николаева<sup>1</sup>, Л. И. Шумаков<sup>5</sup>, А. Ю. Барышников<sup>1</sup>*

## ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ФОТОГЕМСОДЕРЖАЩЕЙ ФЕРРИЖИДКОСТИ В ПЕРЕМЕННОМ МАГНИТНОМ ПОЛЕ

<sup>1</sup> Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва;

<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва;

<sup>3</sup> Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва;

<sup>4</sup> Московская Государственная академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, Москва;

<sup>5</sup> Всероссийский НИИ радиотехники, Москва.

Смешиванием зольей фотогема с золями декстранферрита в воде получили фотогем-содержащие феррижидкости, пригодные для фотогем-магнито-декстранферрит-термосенсибилизации опухолевых клеток. Механизм фотогем-магнито-декстранферрит-термосенсибилизации опухолевых клеток, наиболее вероятно, включает свободнорадикальные процессы.

Понижение выживаемости клеток, содержащих вещества, возбуждаемые светом, зависит от степени их фотосенсибилизации [1 – 13]. Понижение выживаемости клеток, содержащих вещества, возбуждаемые переменным магнитным полем (ПМП) в темноте, зависит от степени их темновой магнитосенсибилизации [5], тогда как понижение выживаемости клеток, содержащих вещества, нагреваемые индукционно и возбуждаемые ПМП или конвенционным нагревом в темноте, зависит от степени их темновой магнито-термосенсибилизации [6].

Мы разработали магнитоуправляемые наночастицы декстранферрита (ДФ) [14] для индукционной гипертермии (ИГ) опухолевых клеток в ПМП [15] и темновой термосенсибилизации (ТС) [6].

Золи ДФ, полученные растворением ДФ в воде, могут служить идеальными магнитными носителями [14 – 16]. При инкубировании клеток асцитической саркомы МХ11 в золях ДФ при +37 °С в концентрации до 80 мг/мл не наблюдалось острой и хронической токсичности или гибели клеток [15]. Острая токсичность при внутривенном и внутриперитонеальном введении ДФ: ЛД<sub>50</sub> 5,0 г/кг для мышей; 0,6 – 1,5 г/кг для кроликов, 0,5 – 0,9 г/кг для собак [16]. Ферримагнитные жидкости (ФЖ), полученные из ДФ, служат магнитными носителями [14 – 16], кроме того, ДФ рассеивает энергию переменного магнитного поля и, таким образом, вызывает гипертермию в зоне своей локализации [15 – 24].

Гематопорфирин (ГП), его производные, например, фотогем (ФГ) [1 – 4] и другие агенты, у которых при облучении светом с длиной волны 600 – 1000 нм возбуждаются электроны, генерируются супероксид-анионрадикалы и синглетный кислород, повышающие цитотоксичность, относятся к классу фотосенсибилизаторов. Мы разработали аналог гематопорфирина,

фотогем [1 – 4], и использовали его при темновой ФГ-магнито-ДФ-термосенсибилизации опухолевых клеток в ПМП [22 – 24].

ФГ по аналогии с ГП [6] генерирует супероксид-анионрадикал, образующий синглетный кислород [5, 8], который приводит опухолевые клетки к разрушению. Кроме того в процессе ФГ-магнитотермосенсибилизации (ФГ-МТС), так же как при фотосенсибилизации, возможно повышение способности интеркалированных в мембране клеток частиц ФГ генерировать свободные радикалы.

Гистидин (Гис) является известным акцептором синглетного кислорода [5]. Увеличение повреждающего действия ГП при гипертермии клеток тормозилось прибавлением β-каротина, известного перехватчика синглетного кислорода или супероксид-анионрадикала, но не тормозилось прибавлением маннитола, который является перехватчиком только гидроксильных радикалов [8].

Гематопорфирин и его производные повышают радиосенсибилизирующий эффект 2-дезоксид-Д-глюкозы на опухолевые клетки, вероятно, посредством дальнейшего понижения запаса энергии, приводящего к обратимому ингибированию репарации ДНК, увеличению цитогенетических повреждений и смерти клеток [8 – 10].

Анализ публикаций по ФГ (Россия) и фотофрину (ФФ, США) показал, что эти соединения очень близки по структуре, физико-химическим свойствам и терапевтическим характеристикам [7 – 12]. Тринадцать больных саркомой (стадия FIGO 1a) с первичными или остаточными (после конвенционной терапии) опухолями различной локализации лечили с применением методов фотодинамической терапии (ФДТ). Через 24 – 72 ч после внутривенного введения производных ГП (Photosan III, 2 мг/кг) опухоли облучали аргоно-

вым лазером. Облучение внутрисполостных опухолей проводили с помощью оптоволоконных устройств под контролем ультразвука.

Поверхностные опухоли и небольшие поражения, расположенные близко к поверхности кожи, облучали падающим светом; при опухолях, расположенных на глубине, превышающей 1 см, применяли внутритканевое облучение. Результаты лечения оценивали через 1 месяц после терапии. Полная ремиссия была достигнута у 8 больных, частичная ремиссия — у 2, не наблюдалось ремиссии у 3 больных с кровоточащим раком эндометрия. Последующую радиотерапию использовали при долечивании этих больных [11]. При лечении ФФ полная и частичная регрессия опухолей регистрировалась у 98 % больных [7], при лечении ФГ — у 94 % [12]. В клинической онкологии ФГ применяют при ФДТ злокачественных опухолей в дозах от 1,5 до 3 мг/кг [12, 13].

Нерешенной технической проблемой фотодинамической терапии является фотовозбуждение вещества в опухоли светом с длиной волны между 600 и 1000 нм, в тканях тела лишь на глубине до 3 мм [7]. При индукционной гипертермии опухолей полная гибель опухолевых клеток достигалась лишь при относительно высоких дозах ДФ [15].

Целью работы явилась оценка цитотоксичности магнитных жидкостей; золей фотогема; магнитных жидкостей, содержащих фотогем при магнито-сенсibilизации (МС) опухолевых клеток фотогемом в темноте (ФГ-МС); при термосенсibilизации (ТС) опухолевых клеток фотогемом в темноте (ФГ-ТС); при комбинации ФГ-МС и ФГ-ТС опухолевых клеток в темноте — магнитотермосенсibilизации (ФГ-МТС), чтобы оценить влияние переменного магнитного поля и индукционной гипертермии при температуре от +37 до +44 °С на гибель и лизис опухолевых клеток в магнитных жидкостях в присутствии фотогема.

В связи с этим, задачей исследования является изучение влияния на выживаемость опухолевых клеток гипертермии; ДФ; ФГ; ДФ + ФГ; Гис; ФГ + Гис; ПМП; ФГ в ПМП; ФГ при гипертермии в ПМП; ДФ + ФГ в ПМП, ФГ + Гис в ПМП в темноте с целью определения оптимальных условий и механизма повреждения опухолевых клеток. Полученный нами декстранферрит [14] и импортный декстран магнетит (ДМ) [17, 18] довольно близки по структуре, физическим и химическим свойствам, по применению в диагностике и терапии опухолей [19]. Это объясняется тем, что оба сое-

динения состоят из твердых наночастиц диаметром 60 – 240 нм, синтезированных одним методом из тех же исходных материалов: декстрана и магнетита.

### Материалы и методы

Образец исходной феррижидкости лиофилизировали и полученный порошок суспендировали в очищенной воде. По модифицированной методике [16] приготовили и испытали 5 декстранферритовых водных феррижидкостей с содержанием ДФ, %: 12,0; 0,6; 0,2; 0,02 и 0,002.

Для феррижидкостей определили рН среды, электрокинетический потенциал частиц, намагниченность насыщения  $M_s$ , удельную абсорбцию энергии (УАЭ) и другие физико-химические характеристики, а также биологические свойства по методам [15, 16]. Аналитическое фракционирование ферримагнитных частиц осуществили постепенным пропусканием 1 % золей ДФ через набор фильтров с использованием устройств фирмы Амикон. Анализ распределения частиц по величине их диаметров провели с использованием систем Submicron Particle Sizer NICOMP™ 380 PSS NICOMP “Particle Sizing Systems, Inc.” Santa Barbara, Calif., USA.

ФГ получали обработкой гемина 50 % раствором бромистого водорода в уксусной кислоте с последующим прибавлением уксусной кислоты, ацетата натрия и воды. Выпавший из раствора диацетат производного гемина обрабатывали 0,1 н. раствором NaOH в течение 1 ч. ФГ осаждали уксусной кислотой, фильтровали, промывали и сушили на воздухе. Получался темно-фиолетовый кристаллический порошок, представляющий собой сложную смесь мономерных и олигомерных полусинтетических порфиринов. Растворение полученного порошка в 0,5 % гидроксиде натрия с последующим его доведением до рН 7,4 1 н. хлористоводородной кислотой привело к образованию золя ФГ. Готовили и тестировали 8 водных золей фотогема, которые получили по модифицированной методике [2]. Концентрация фотогема в полученных золях (мкг/мл) — 650; 65; 6,5; 3,2; 1,6; 1,3; 0,12; 0,02. Физико-химические характеристики и биологические свойства золей ФГ определяли как представлено в [1 – 4, 7]. Аналитическое фракционирование твердых частиц ФГ осуществляли постепенным пропусканием 1 % водных золей ФГ через мембранные фильтры (100 нм, 45 нм, 20 нм, ХМ300, ХМ100, ХМ50, UM20-UM05u) под давлением азота 0,1 – 0,3 ати на устройствах Amicon TSF-10 thin-channel ultrafiltration system or in Model 12 and Model 202 cells, и на колонке для геля фильтрации. Олигомерную структуру ФГ определили при геле-фильтрации, на сорбенте Fractogel HW-40S (Merk, Germany), в системе ДМСО – толуол – уксусная кислота (1/1/1). При определении распределения твердых частиц по величинам их диаметров в золях ФГ использовали Gaussian/Nicomp and Volume-weighted Gaussian анализ распределения частиц в разбавленных золях ФГ, при котором использовали (Submicron Particle Sizer NICOMP™ 380 PSS NI-

Таблица 1  
Влияние конвенционной гипертермии на выживаемость клеток Р388 при температуре от +37 до +44 °С, экспозиция 30 мин

Пробирка	Выжившие клетки, %	Мертвые клетки, %	Лизированные клетки, %	Температура, °С
1	0,0	97 ± 6	3 ± 0,6	43 – 44
2	4 ± 0,8	96 ± 5,8	2 ± 0,6	42 – 43
3	48 ± 3,4	52 ± 3,6	2 ± 0,5	41 – 42
4	91 ± 5,5	9 ± 1,4	1 ± 0,4	39 – 40
5	95 ± 5,8	5 ± 1,0	1 ± 0,3	37 – 38
6	96 ± 5,8	4 ± 0,8	0,0	37

COMP "Particle Sizing Systems, Inc." Santa Barbara, Calif., USA).

Полученный нами ФГ по своим физико-химическим характеристикам и терапевтическим свойствам очень близок ГП и ФФ [4, 7] и относится к производным гематопорфиринов, структурные формулы которых представлены [6].

Два типа опухолевых клеток: адаптированной карциномы яичников человека (carcinoma ovarii, CaOv) и мышинового асцитического лимфолейкоза P388, — инкубировали при воздействии физических факторов в присутствии или без упомянутых выше реагентов и факторов. Переменное магнитное поле достигалось внутри индукционной катушки, охлаждаемой водой (диаметр катушки 9 см, 20 витков с расстоянием между витками 0,9 см). Клетки последовательно нагревали от +37 до 44 °С и подвергали воздействию ПМП в индукционной катушке при частоте 0,88 МГц, индукции 9,3 кА/м и мощности 0,15 кВт. Определяли выживаемость клеток CaOv и P388 как результат их экспозиции при различных температурах в нормальных условиях и в ПМП при различных концентрациях ФГ в присутствии гистидина (ФГ + Гис). В предварительных опытах *in vitro* определяли параметры температуры и ПМП, необходимые для сенсibilизации опухолевых клеток, содержащих ФГ. Изучали магнито-термосенсibilизацию клеток частицами ФГ в темноте, достигаемую одновременно действием ПМП и гипертермией в проточном термостате. При ФГ-термосенсibilизации пробирки с суспензией опухолевых клеток (концентрация 10<sup>6</sup> мл) совместно с реагентами (ФГ, Гис, ФГ + Гис, 0,9 % раствор NaCl) помещали в проточный термостат; при ФГ-магнитосенсibilизации такие же пробирки помещали в центр индукционной катушки; при ФГ-МТС термостатированные пробирки помещали в центр индукционной катушки и выдерживали 30 мин в ПМП в темноте при периодическом выключении генератора ПМП для поддержания постоянной температуры. Поэтому повышение температуры клеток не было пропорционально повышению концентрации ДФ.

Для подсчета исходного числа клеток до их обработки, а также выживших, мертвых и лизированных клеток после обработки, их окрашивали трипановым синим. Разность между исходным и конечным числом клеток отнесли за счет лизиса.

Раствор трипанового синего 0,4 % 0,5 мл, 0,3 мл раствора Хенкса и 0,2 мл суспензии клеток в пробирке перемешивали и выдерживали 6 мин. Кончиком пипетки вводили небольшие количества суспензии в обе камеры гемоцитометра. Подсчитывали все клетки в 1 мм центральном квадрате и угловых квадратах 1 камеры. Мертвые клетки окрашивались в синий цвет. Отдельно подсчитывали выжившие и мертвые клетки.

Флуоресцентную микроскопию клеток проводили после их обработки 3 – 15 мин растворами, содержащими летальные дозы ФГ, с последующим отмыванием 0,9 % раствором NaCl.

Выживаемость клеток CaOv или P388 оценивали подсчетом выживших клеток на гемоцитометре после экспозиции клеток в различных условиях с NaCl, ДФ, ФГ, ФГ + ДФ, ФГ + Гис. Взаимодействие ДФ с клетка-

ми изучали с учетом рекомендаций [16]. Результаты конвенционной гипертермии, ПМП, комбинированного действия индукционной гипертермии и магнито-термосенсibilизации обрабатывали статистически. Результаты представлены как средние значения ( $\pm$  SD), полученные в 4 независимых опытах.

### Результаты и их обсуждение

В процессе получения ДФ и ДМ было проведено сравнение химического состава полученных препаратов. Сравнение показало, что ДФ по составу близок ДМ: ДФ представляет собой темно-коричневые листочки и содержит около 27 %  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 71 % декстрана и 2 % воды; величина удельной намагниченности насыщения образца  $\sigma$  составила 18 А · м<sup>2</sup>/кг. Инфракрасный (ИК) спектр, измеренный в таблетках KBr, имел абсорбцию при  $\nu_{\max}(\text{см}^{-1}) = 3400, 2900, 1630, 1350 - 1420, 1000 - 1150$  и 550 – 600. Летальная доза на мышах при внутривенном введении (ЛД<sub>50</sub>) — 5 г/кг.

Феррижидкость, содержащая 12 % ДФ, представляла собой темно-коричневый золь; pH среды 7, величина электрокинетического потенциала частиц +15 мВ, намагниченность насыщения  $M_s$  0,7 кА/м. ДФ рассеивает энергию переменного магнитного поля и таким образом вызывает гипертермию в месте своего нахождения. Удельная абсорбция энергии (УАЭ) ДФ 240 – 360 Вт/г Fe.

При обезвоживании золя ДФ прибавлением этанола, метанола, ацетона или октана, а также путем лиофилизации с последующим растиранием остатка в фарфоровой ступке получили коричневый гигроскопичный порошок. Полученный порошок растворим в воде с образованием коллоидных растворов с концентрацией частиц магнитной фазы 0,001 – 60,0 масс. %. Повторная лиофилизация ДФ феррижидкостей и растворение ДФ в воде не приводит к значительным изменениям его свойств. Эти результаты согласуются с гипотетической моделью строения микросфероидов ДФ. Согласно этой модели микросфероид ДФ состоит из центрального ядра (сферического кристаллита  $\gamma$ -оксида железа), покрытого слоем химически связанных с ядром и скрученных молекул декстрана. Твердой фазой феррижидкостей на основе ДФ и воды являются мицеллы, кристаллические ядра которых покрыты набухшим слоем гидратированных молекул декстрана.

Таблица 2  
Влияние декстранферрита (ДФ) на выживаемость клеток CaOv при экспозиции в ПМП 30 мин при индукционном нагреве от +37 до +44 °С.

Пробирка	Выжившие клетки, %	Мертвые клетки, %	ДФ, мг/мл	Температура, °С
1	0,0	100 ± 6	60,0	43 – 44
2	4 ± 0,8	96 ± 5,8	6,0	42 – 43
3	48 ± 3,4	52 ± 3,6	1,00	41 – 42
4	91 ± 5,5	9 ± 1,4	0,10	39 – 40
5	95 ± 5,8	5 ± 1,0	0,01	37 – 38
6	96 ± 5,8	4 ± 0,8	0,00	37

Микросфероиды ДФ находятся в золе в виде мицелл. Структура аморфного декстранового слоя мицелл ДФ представлена тонкими волнистыми “ворсинками” различной длины. Последние представляют собой цепные молекулы декстрана, химически присоединенные различными участками к кристаллическому ядру, свободные концы молекул декстрана совершают колебания под воздействием броуновского движения молекул среды в золе.

Данные просвечивающей электронной микроскопии позволили оценить размеры частиц ДФ: максимальный диаметр микрокристаллов и микросфероидов равен 12 и 240 нм, соответственно. Полученные результаты согласуются с данными аналитического фракционирования частиц, их динамического светорассеяния (193 – 240 нм) и Гаусовского анализа распределения частиц по размерам в разбавленных растворах (рисунок). Изучаемые водные золи ДФ являются ферромагнитными жидкостями, дисперсная фаза которых представляет собой мицеллы. В разбавленных золях, вне сильных электрических и магнитных полей, мицеллы имеют сферическую форму и проявляют взаимное отталкивание. В неоднородном постоянном магнитном поле индукцией 0,01 – 3 Тл мицеллы ДФ в золях, в результате их взаимного притяжения, проявляют магнитную упорядоченность. Водные золи ДФ, имеющие концентрации от 1 до 55 вес. %, не проявляют необратимого расслоения при хранении в течение 1 года при +4 °С и выдерживают экспозицию до 1 ч в неоднородном постоянном магнитном поле индукцией до 0,2 Тл.

Опухолевые клетки многих типов при 72 ч экспозиции в 1 % золях ДФ способны абсорбировать мицеллы ДФ и метаболизировать декстрановый слой, покрывающий кристаллическое ядро. В результате переваривания органической компоненты мицелл ДФ в клетках “облысевшие” ферритовые ядра (10 – 12 нм в диаметре), потерявшие коллоидную защиту, образуют внутри клеток конгломераты диаметром 0,1 – 1,0 мкм, состоящие из смеси  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [20, 21]. Конгломераты  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  легко определяются с помощью микроскопа при увеличении  $40 \times 10$ . При образовании ферритовых конгломератов в клетках не происходит заметного понижения удельной намагниченности насыщения частиц, но резко понижается УАЭ из-за увеличения диаметров частиц оксидов железа до размеров, превышающих размеры однодоменной структуры. Опухолевые клетки, содержащие 3 – 12 видимых в

микроскоп конгломератов, продолжают некоторое время развиваться и делиться. Учитывая это и низкую токсичность ДФ при внутрисосудистом введении животным, феррижидкости на основе ДФ могут стать идеальными магнитными носителями [15].

Чтобы определить оптимальные условия, при которых проявляется максимальный пироэлектрический эффект ДФ в ПМП, измерили частотную зависимость потерь при гистерезисе 30 % золя ДФ. Было найдено, что величина добротности ( $Q$ ) ДФ в ПМП монотонно понижается с увеличением частоты выше 0,19 МГц. Принимая во внимание полученные результаты, выбрали частоту 0,88 МГц. Определения показали прямую зависимость понижения намагниченности золя и скорости индукционного нагрева от уменьшения концентрации ДФ. В предварительных опытах *in vitro* определили оптимальные параметры температуры и ПМП, необходимые для возбуждения ФГ в пробирках с опухолевыми клетками. На частоте 0,88 МГц нагрев 0,9 % раствора NaCl всегда был ниже уровня чувствительности спиртового термометра. Исследуемая 12 % феррижидкость ДФ на этой частоте проявила удовлетворительную скорость нагрева до +2 °С/мин.

Результаты Gaussian/Nicomp-анализа распределения частиц по величине их диаметров в 0,001 % золе ДФ представлены на рисунке.

Результаты, полученные при изучении цитотоксичности зелей, представлены в табл. 1 – 4. Не отмечено гибели значительного числа клеток от хронической или острой токсичности, когда клетки инкубировали только в феррижидкостях с концентрацией ДФ до 60 мг/мл или только в ПМП до 6 ч при 37 °С. Однако, когда клетки P388 или CaOv выдерживали в ПМП при температурах от +41 до +44 °С 30 мин в присутствии феррижидкости, наблюдался выраженный гипертермический эффект (табл. 2).

Обобщенный результат распределения частиц по величине их диаметров в золе ФГ представлен в работе [6]. Гель-хроматограмму фотогема [6] получили на колонке для гельфильтрации:  $400 \times 13$  мм; насос, JASCO PU-980; скорость элюции 0,25 мл/мин; скорость бумаги 0,03 мм/мин.

В результате проведенных исследований по механизмам разрушения опухолевых клеток была определена роль: ДФ, ФГ, Гис, ФГ + ДФ, ФГ + Гис; конвенционной гипертермии, ПМП, индукционной гипертермии в ПМП; темновой ФГ-магнито-термосенсибилизации клеток.

ФГ по аналогии с ГП возбуждается в ПМП в темноте в результате повышения энергии электронов, генерирует синглетный кислород и супероксид-анион радикалы. Синглетный кислород, являясь сильным окислителем, вызывает разрушение опухолевых клеток.

Экспериментальные результаты определения цитотоксичности конвенционной и индукционной гипертермии представлены в табл. 1, 2; цитотоксичность, проявляемая фотогемом, в различных условиях представлена в табл. 3, 4.

Не отмечена гибель клеток при хронической или острой токсичности, когда клетки инкубировали при +37 °С в золях ФГ с концентрацией до 0,01 мкг/мл

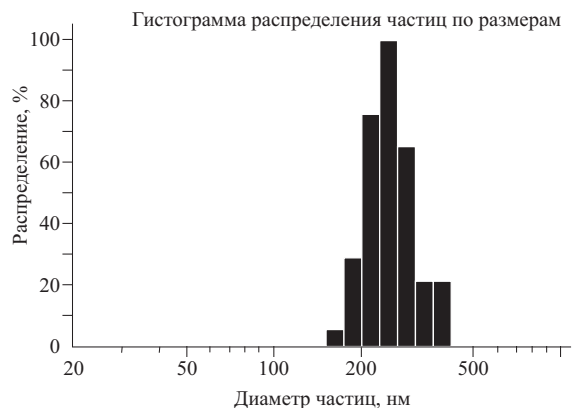
Таблица 3  
Влияние фотогема (ФГ) на выживаемость клеток CaOv при экспозиции 30 мин в ПМП при +37 °С.

Пробирка	Выжившие клетки, %	Мертвые клетки, %	Лизированные клетки, %	ФГ, мкг/мл
1	0,0	0,0	100 ± 6	325,00
2	9,5 ± 1,5	60 ± 4,0	30,5 ± 2,5	32,50
3	18 ± 1,9	54 ± 3,7	28 ± 2,5	3,25
4	87,3 ± 5,5	5,7 ± 1,0	7,0 ± 1,3	0,65
5	91 ± 5,5	5 ± 1,0	4 ± 0,8	0,06
6	95 ± 5,8	4 ± 0,8	1 ± 0,1	0,00

или только в ПМП до 6 ч при +37 °С. Отмечено уменьшение фракции выживших клеток при повышении температуры от 41 до 44 °С (табл. 1). Фракция мертвых клеток увеличивалась пропорционально повышению температуры от 41 до 44 °С; фракция выживших клеток была высокой при температуре от 37 до 41 °С, при 42 – 43 °С — незначительной, и при 43 – 44 °С — отсутствовала. Температура в пробирках 1 – 6 повышалась пропорционально увеличению концентрации ДФ; фракция мертвых клеток увеличивалась пропорционально увеличению концентрации ДФ; фракция выживших клеток была высокой при температуре от 37 до 41 °С, при 42 – 43 °С — незначительной, и при 43 – 44 °С — отсутствовала (табл. 2). Согласно полученным результатам при равных концентрациях ФГ выживаемость клеток в 3 раза меньше при комбинированном действии ФГ+ПМП по сравнению с действием только ФГ.

Так, при концентрации 32,5 мкг/мл выживаемость клеток 9,5 и 29 % соответственно (пробирка 2 в табл. 3 и 4).

Цитотоксичность ФГ при +41 °С в 3 раза ниже, чем цитотоксичность ФГ в комбинации с ПМП при тех же температуре и концентрации. Так, выживаемость клеток при +41 °С и концентрации ФГ 32,5 мкг/мл соответствовала 10 % по сравнению с 29 % (пробирка 2, табл. 4) при температуре +37 °С. Таким образом, полученные результаты подтверждают преимущества ФГ-термосенсибилизации, ФГ-магнитосенсибилизации и ФГ-магнито-ДФ-термосенсибилизации клеток. Сравнение данных подтверждает равноценность цитотоксических эффектов комбинированного действия на клетки CaOv и P388. ФГ-термосенсибилизация приводит к понижению выживаемости клеток, содержащих фотогем, при темновой гипертермии. ФГ-магнитосенсибилизация приводит к понижению выживаемости клеток, содержащих фотогем, в ПМП в темноте. ФГ-магнито-термосенсибилизация приводит к понижению выживаемости клеток, содержащих фотогем, в ПМП при темновой гипертермии. Действие ФГ в нетоксичных дозах зависит от величины применяемой дозы при +37 °С, его повреждающее действие на опухолевые клетки значительно повышается в ПМП при +41 °С и выше. Эти данные подтверждают возможность использования конвенционной гипертермии и ПМП в комбинации, представляющей собой ФГ-магнито-термосенсибилизацию опухолевых клеток. Повышение повреждающего действия клеток фотогемом в ПМП в результате ФГ-магнито-термосенсибилизации эффективно подавляется прибавлением гистидина, который является перехватчиком супероксид-анион радикала и синглетного кислорода. В присутствии нетоксичных доз ФГ + Гис фракция выживших клеток уменьшается пропорционально понижению температуры. Определены значительные различия между цитотоксическими эффектами, вызванными фотогемом в ПМП при +37 °С и +41 °С при тех же концентрациях фотогема. Таким образом, при нетоксичных дозах ФГ для повреждения опухолевых клеток требуется ФГ-магнито-сенсибилизация и ФГ-термосенсибилизация или их комбинация, ФГ-магнито-термосенсибилизация. Определены значимые различия между цито-



Распределение твердых частиц по величине диаметров в 0,001 % феррижидкости декстранферрита.

токсическими эффектами, вызванными индукционной гипертермией, магнито-термосенсибилизацией и комбинацией индукционной гипертермии с магнито-термосенсибилизацией.

Флуоресцентная микроскопия клеток, обработанных ФГ, с последующим отмыванием физиологическим раствором, показала, что в основном ФГ был локализован в мембранных структурах клеток. Учитывая перечисленные возможные следующие механизмы проявления цитотоксического действия ФГ на клетку: твердые частицы ФГ, аналогично другим липофильным производным ГП, интеркалируют между липидными молекулами мембраны, индуцируют мембрано-зависимые повреждения, приводящие к морфологической денатурации клеточных мембран, к изменению соотношения “насыщенные/ненасыщенные жирные кислоты” в составе мембранных липидов, и к образованию химических связей, сшивающих компоненты клеточных мембран и разрывы цепей ДНК. Гибель и лизис опухолевых клеток объясняются в этих случаях достижением концентрации ФГ, обеспечивающей скорость нанесения повреждений, превышающую скорости внутриклеточных репараций.

Механизмы сенсибилизации клеток с их последующими гибелью и лизисом можно объяснить поглощением энергии ПМП частицами фотогема, переходом их в возбужденное синглетное состояние, а также процессами релаксации энергии возбуждения. Релаксация может осуществляться путем интерконверсии в первое триплетное состояние при дальнейшем взаимодействии с субстратом или O<sub>2</sub> или возвращением в

Таблица 4  
Влияние ФГ на выживаемость клеток CaOv при экспозиции 30 мин в проточном термостате при +37 °С (пробирки 1 – 3) и при +41 °С (пробирки 4 – 6).

Пробирка	Выжившие клетки, %	Мертвые клетки, %	Лизированные клетки, %	ФГ, мкг/мл
1	3 ± 0,6	6 ± 1,1	91 ± 5,5	325
2	29 ± 2,5	50 ± 3,5	21 ± 2,0	32,5
3	66 ± 4,3	16 ± 1,8	18 ± 1,9	3,25
4	10 ± 1,5	55 ± 3,8	35 ± 2,8	32,5
5	38 ± 2,9	39 ± 3,0	23 ± 2,2	3,25
6	82 ± 5,1	14 ± 1,7	4 ± 0,8	0,32

основное состояние с испусканием энергии. Все факторы, снижающие устойчивость клеток и тормозящие их репарационные процессы (гипертермия, снижение рН, радиация, химиотерапия), повышают разрушительный эффект ФГ.

Положительные результаты лечения опухолей экспериментальных животных в предварительных опытах подтверждают возможность создания на основе ФГ-МТС опухолевых клеток нового способа терапии, который по аналогии с фотодинамической терапией (ФДТ) можно назвать магнито-термодинамической терапией (МТТ).

ФГ-МТТ по сравнению с ФДТ представляет следующие преимущества: возбуждение частиц фотогема ПМП на любой глубине тканей тела; ФГ-дозо-зависимое повышение повреждающего действия гипертермии и ПМП на опухолевые клетки; отсутствие специфической токсичности при физиологических параметрах гипертермии и ПМП (температура, частота, индукция, сила и мощность).

Действие ФГ зависит от величины применяемой дозы при +37 °С, его повреждающее действие на опухолевые клетки значительно повышается при +41 °С и выше. Дальнейшие исследования *in vitro* и *in vivo* позволят подобрать оптимальные дозы ФГ + ДФ и параметры интенсивности и продолжительности действия ПМП на опухоли. Комбинация конвенционной гипертермии с магнито-термосенсибилизацией при лечении опухолей фотогемом является фундаментом метода магнито-термодинамической терапии опухолей.

Перемешивание фотогема с растворами гидроксида натрия с последующей нейтрализацией хлористоводородной кислотой приводит к образованию зольей ФГ, пригодных для ФГ-магнито-термосенсибилизации опухолей. Смешивание зольей фотогема с золями декстранферрита в воде приводит к образованию фотогем-содержащих феррижидкостей, пригодных для фотогем-магнито-декстранферрит-термосенсибилизации опухолевых клеток. Механизм ферримагнитного нагрева, наиболее вероятно, включает процесс потерь при магнитной релаксации. Фотогем-магнито-декстранферрит-термосенсибилизация опухолевых клеток, наиболее вероятно, включает свободнорадикальные процессы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. Ф. Миронов, А. Ю. Нокель, и др. Патент России № 2063671.

2. A. F. Mironov, A. N. Nizhnik and A. Yu. Nockel, *J. Photochem. Photobiol.*, **4**, 297 – 306 (1990).
3. A. F. Mironov, *Proc. of the Int. Conf. on Photodynamic Therapy*, Sofia (1989), p. 13.
4. A. F. Mironov, A. N. Nizhnik and A. Yu. Nockel, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **6**, 337 – 341 (1990).
5. M. Babincova, D. Leszczynska, P. Sourivong, and P. Babinec., *J. Magn. Magn. Mater.*, **225**, 194 – 196 (2001).
6. Н. А. Брусенцов, Л. Х. Комиссарова, Т. Н. Брусенцова., *Хим.-фарм. журн.*, **37**(6), 10 – 15 (2003).
7. H. Kato, N. Kawate, K. Kinohita, et al., Ciba Found Symp, 146, Photosensitizing compounds: their chemistry, biol. and clinical use, Kyoto (1989), pp. 183 – 197.
8. B. S. Dwarakanath, J. S. Adhicari, and V. Jain., *Radiation Oncol. Biol. Phys.*, **43**(5), 1125 – 1133 (1999).
9. Z. Lacos, and T. Berki., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **29**, 185 – 191 (1995).
10. G. Moger, and G. Kohler, N. Getoff, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **33**, 27 – 37 (1996).
11. H. Koran and G. Alth, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **36**, 189 – 191 (1996).
12. В. И. Чиссов, О. К. Скобелкин, А. Ф. Миронов и др., *Хирургия*, № 12, 3 – 6 (1994).
13. V. V. Sokolov, V. I. Chissov, R. I. Yakubovskya, et al., *Progress in biomedical optics Europto series, Proceeding of Photochemotherapy: Photodynamic Therapy and Other Modalities II. Chairs / S. B. Brown, et al. (ed.)*, 7 – 8 September 1996, Viena, Austria, 2924 (1996), pp. 322 – 329.
14. A. I. Autenshlyus, N. A. Brusentsov and A. Lockshin, *J. Magn. Magn. Mater.*, **122**, 360 – 363 (1993).
15. N. A. Brusentsov, V. V. Gogosov, T. N. Brusentsova, et al, *J. Magn. Magn. Mater.*, **225**, 113 – 117 (2001).
16. O. A. Kuznetsov, N. A. Brusentsov, N. Y. Jurchenko, et al., *J. Magn. Magn. Mater.*, **194**, 83 – 89 (1999).
17. U. O. Häfeli and G. J. Pauer, *J. Magn. Magn. Mater.*, **194**, 76 – 82 (1999).
18. D. C. F. Chan, D. B. Kirpotin and P. A. Bunn, *J. Magn. Magn. Mater.*, **124**, 374 – 378 (1993).
19. A. Jordan, R. Scholz, K. Maier-Hauff, et al., *J. Magn. Magn. Mater.*, **225**, 118 – 126 (2001).
20. N. A. Brusentsov, T. S. Gendler, E. A. Haliulina, et al., *Book of abstracts of 9-th IPCMF-2000*, Plyos Russia (2000), pp. 77 – 79.
21. N. A. Brusentsov, T. S. Gendler, T. N. Brusentsova, *Magnetisation of ferrifluids and effects of intracellular deposition of ferrite nanoparticles. Abstracts ICM 2003*, July 27 – August 1, Roma, Italy (2003), p. 756.
22. N. A. Brusentsov, L. Kh. Komissarova, A. A. Kuznetsov, *Fourth Int. Conf. on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Tallahassee, Florida, USA (2002), pp. 81 – 84.
23. N. A. Brusentsov, L. Kh. Komissarova, A. A. Kuznetsov, *European Cells and Materials*, **3**(2), 70 – 73 (2002).
24. N. A. Brusentsov, A. V. Reshetnikov, E. Yu. Filinova, *notechnology of magnetic fluids (RANMF-2003)*, New Delhi, India (2003), pp. 182 – 185.

Поступила 15.03.04.

## PHOTOGEM CONTAINING FERRIFLUIDS CYTOTOXICITY BY VARIABLE MAGNETIC FIELD

N. A. Brusentsov<sup>1,2</sup>, L. Kh. Komissarova<sup>2</sup>, T. N. Brusentsova<sup>3</sup>, F. S. Bayburtskiy<sup>2</sup>, A. F. Mironov<sup>4</sup>, A. V. Lubeshkin<sup>4</sup>, E. Yu. Filinova<sup>1</sup>, T. O. Nikolaeva<sup>1</sup>, L. I. Shumakov<sup>5</sup>, A. Yu. Baryshnikov<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> N. N. Blokhin Russian Oncology Research Center RAMS, Russian Federation, Moscow, E-mail: Gala752@mail.ru

<sup>2</sup> N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Russian Federation, Moscow, E-mail: Chembio@sky.chph.ras.ru, Bayburt@mail.ru

<sup>3</sup> D. I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Russian Federation, Moscow, E-mail: Mara@muctr.edu.ru

<sup>4</sup> M. V. Lomonosov Moscow state Academy of Fine Chemical Technology, Russian Federation, Moscow, E-mail: mith@mitht.ru

<sup>5</sup> The All-Russia Scientific Research Institute of a Radio Engineering, Russian Federation, Moscow, E-mail: skala@aha.ru

By mixture of photogem (PG) sols with dextran-ferrite (DF) sols PG containing ferrimagnetic fluids useful for the tumor cells PG-magneto-DF-thermosensitization in AC magnetic field were obtained. The mechanisms of the tumor cells PG-magneto-thermosensitization most likely involves free-radical processes.