

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

© Коллектив авторов, 2008

Н. А. Брусенцов^{1, 2}, Т. Н. Брусенцова¹, Е. Ю. Филинова³, Ю. А. Пирогов⁴,
Д. А. Куприянов⁴, А. И. Дубина⁴, М. Н. Шумских⁴, Л. И. Шумаков⁵,
Н. Я. Юрченко¹, Е. А. Анашкина¹, А. А. Шевелев¹

МАГНИТОГИДРОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРМОХИМИОТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ НАНОПРЕПАРАТАМИ С МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНЫМ МОНИТОРИНГОМ

¹ Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва;

² Институт механики МГУ, Москва;

³ НОУ Прогрессивные медицинские исследования, Москва;

⁴ Центр магнитной томографии и спектроскопии МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва;

⁵ Всероссийский НИИ радиотехники, Москва

Внутривенным введением золя декстранферрита получили усиление МР-изображений при T₂-взвешенном градиент-эхо (500/15) сканировании с визуализацией границ инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, макро- и микро-метастазов лимфоцитарного лейкоза Р388 и карцином: Эрлиха и Льюис. При магнитогиродинамической термохимиотерапии (МТХТ) с применением магнитной жидкости, содержащей циклофосфамид (M_s, 8,6 кА/м, рН 7,4, ζ + 13 мВ), при 46 °С 30 мин в переменном магнитном поле (0,88 МГц, 7,2 кА/м, 0,15 кВт) с отсасыванием некротических масс (ОНМ) регрессия опухоли Р388 объемом (~ 110 мм³) у мышей BDF1 до метастазирования 40 %, увеличение продолжительности жизни (УПЖ) 310 %; при опухолях (~ 330 мм³), после метастазирования и МТХТ-ОНМ с долечиванием циклофосфамидом УПЖ 220 %.

Современные диагностические и лекарственные средства и технологии необходимы для повышения эффективности комбинированной терапии рака [1 – 3], уменьшения числа неоперабельных опухолей, которые не поддаются лечению из-за технических ограничений [4 – 36]. Регионарная индукционная гипертермия применяется в экспериментальной [1 – 17, 21 – 27, 29 – 32, 35, 36] и клинической онкологии [33, 34]. Нами разработаны МР-контрастные [6, 11, 30] и магнитоуправляемые противоопухолевые препараты (МПП) на основе наночастиц декстранферрита (ДФ) [1, 3 – 9, 21, 22, 26, 27, 29]. У гадолиний-замещенных ферритов (ГФ) общей формулы: Fe²⁺ [Gd_z³⁺ Fe_{2-z}³⁺]O₄, [19, 20, 22, 30] по мере увеличения Z и уменьшения содержания ионов Fe наблюдается переход от T₂ МР-контрастных препаратов к T₁ МР-контрастным препаратам.

Известны марганец-цинковые ферриты общей формулы:

$Zn_x^{2+} Mn_y^{2+} Fe_{1-x-y}^{2+} [Gd_z^{3+} Fe_{2-z}^{3+}]O_4$, где $0 < y < 1$, $0 < x < 1$, $0 < z < 1$,

[30] и другие ферриты, замещенные лантаноиды [19, 20, 22, 30, 32], никель-медные частицы (НМ) [36, 37], манганиты (МГ) и замещенные манганиты (ЗМ) [37, 38].

Наночастицы, покрытые цитрат-ионами или декстраном в водных золях, характеризуются низкой токсичностью на различных экспериментальных животных [9, 23, 29], они обладают высокой удельной аб-

сорбцией энергии (УАЭ) переменного магнитного поля (ПеМП), трансформируют поглощенную энергию в теплоту и вызывают гипертермию [1 – 9, 11, 14, 17, 21 – 27, 29, 30, 37, 38]. Частицы ГФ, МГ, ЗМ и НМ имеют меньшие по сравнению с MnFe₂O₄ (МФ) и Fe₃O₄ величины температуры Кюри (T_C) [30, 32, 36 – 38], удельной намагниченности насыщения (σ) УАЭ и соответственно низкие скорости индукционного нагрева: МФ > ДФ > ГФ > МГ > ЗМ > НМ [19, 20, 22, 29, 30, 32, 36 – 38].

Цитостатическое средство алкилирующего типа циклофосфамид (ЦФ) растворимо в воде [39]. Золи, содержащие ДФ, противоопухолевые средства алкилирующего типа [6, 14, 29] и антибиотики [15, 16] проявляют цитостатическую активность на ряде экспериментальных мышинных опухолей [7, 15] и на спонтанной опухоли собак [16].

Деструкция многих опухолевых клеток достигается при регионарной гипертермии повышением температуры до +44 ... +45 °С непосредственно в опухоли [3 – 5, 7, 23 – 25, 29 – 31]. Частичная деструкция опухолевых клеток достигается повышением температуры всего тела до +43 °С с одновременным охлаждением головы [18]. При распространенных формах рака для полного уничтожения опухолевых клеток в организме требуется одновременный нагрев тела до +43 °С и опухоли до +45 °С, либо термохимиотерапия, при которой сочетается действие цитостатических

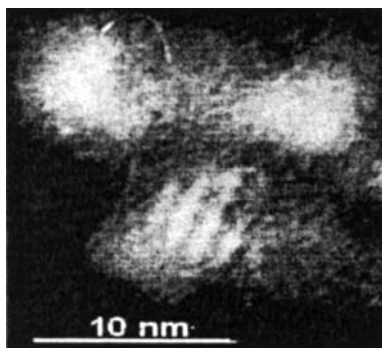


Рис. 1. Кристаллические ядра наночастиц ДФ диаметром 6 – 12 нм. Микроскоп Филипс EM400, разрешение 4 Å. Исследования проведены в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

средств, гипертермии и отсасывания некротических масс с остатками препаратов [4 – 6, 23, 24, 28, 29].

Одним из эффективных способов диагностики является магнитно-резонансная томография (МРТ) [40], основанная на магнитной гетерогенности биологических систем [40, 41]. Введение в организм пара-, ферри- и ферромагнитных контрастных средств увеличивает магнитную гетерогенность системы и приводит к повышению контраста органов и тканей млекопитающих. Магнито-контрастные средства делятся на МР-позитивные и МР-негативные. МР-позитивные средства усиливают сигнал от протонов, МР-негативные — ослабляют этот сигнал. К МР-позитивным средствам относятся препараты, обладающие низкой намагниченностью: магневист и дотарем. К МР-негативным средствам относятся препараты, обладающие высокой намагниченностью [6 – 11, 19, 20].

Ранее при работе на биоспектротомографе BIOSPEC BC 70/30 USR (Bruker) [6] и отечественном томографе МТ 2500 [11] нами установлено, что наночастицы ДФ ослабляют сигнал от протонов [11], повышают контраст органов и тканей, усиливают контраст изображения при МРТ *in vivo* [6].

Нерешенными молекулярно-биологическими и технологическими проблемами МРТ и лечения злокачественных опухолей являются создание средств избирательного контрастирования и обезвреживания опухолевых клеток на ранних стадиях рака (предрака), визуализации и мониторинга канцерогенеза и автоматического поддержания требуемых температур в опухоли, метастазах и в целостном организме длительное время, достаточное для полного клиренса опухолевых клеток.

Целью настоящей работы являлась оценка:

- качества визуализации первичных опухолей, границ инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, макро- и микро-метастазов ферримагнетиками в сочетании с Mn, Gd-содержащими контрастными средствами;

- противоопухолевой активности МПП на основе ДФ № 362, содержащих ЦФ, при магнитогидродинамической термохимиотерапии (МТХТ) лимфоцитарного лейкоза Р388 и карцином Эрлиха и Льюис на мы-

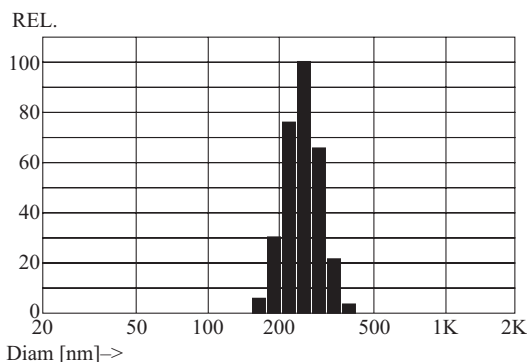


Рис. 2. Распределение твердых наночастиц по величине диаметров в 0,001 % золе декстранферрита: основная часть дисперсной фазы золя представлена наночастицами ДФ диаметром от 200 до 240 нм. Исследования проведены в НИИ ЭД и ТО ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

шах BDF₁ на частоте 0,88 МГц при индукции 7,2 кА/м и мощности 0,15 кВт в сравнении с химиотерапией только ЦФ.

Материалы и методы

Нами испытаны 3 водных золя на основе ДФ № 362, которые были приготовлены по модифицированному методу [7]. Образец исходного золя лиофилизировали и получили ДФ. Удельную намагниченность насыщения (σ) ДФ; его исходную магнитную восприимчивость (χ_{init}); дзета потенциал (ζ) магнитоуправляемого золя; удельную абсорбцию энергии золя; намагниченность насыщения (M_s) 20, 30 и 40 % зольей определяли методами, описанными в [7 – 9]; просвечивающую электронную микроскопию проводили на приборе фирмы Филипс, разрешение 1,4 Å, аналитическое мембранное фракционирование, Gaussian/Nicompr и Volume-weighted Gaussian анализ распределения частиц по величине их диаметров и другие физические, химические и биологические свойства зольей на основе ДФ определяли методами, представленными в работах [6 – 9, 12, 13, 15 – 17, 23 – 29].

По терапевтическим эффектам ЦФ близок алкерану и сарколизину [14], но растворим в воде и более устойчив к гидролизу. Для предупреждения гидролиза ЦФ его смешивание с золем ДФ проводили непосредственно перед введением комплексного препарата ДФ-ЦФ в опухоли.

120 мышам BDF₁ массой 18 – 21 г, возраст 6 – 10 нед, разводки вивария ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, имплантировали под кожу правой лопатки клетки лимфоцитарного лейкоза Р388 1×10^6 кл/мышь в стерильном 0,9 % растворе хлорида натрия, рН 7,4, в объеме 0,1 мл, в соответствии с рекомендациями [42]. На 5 – 6 сутки после прививки лимфоцитарного лейкоза Р388 опухоли пальпировали и выбрали 60 мышей, диаметр опухолей которых достигал 6 – 7 мм. Объем каждой опухоли вычисляли как $V = 0,5(l \cdot n^2)$, где V — объем опухоли, l — длина, n^2 — площадь. Опыты проводили, когда средний объем опухолей достигал 110 мм³.

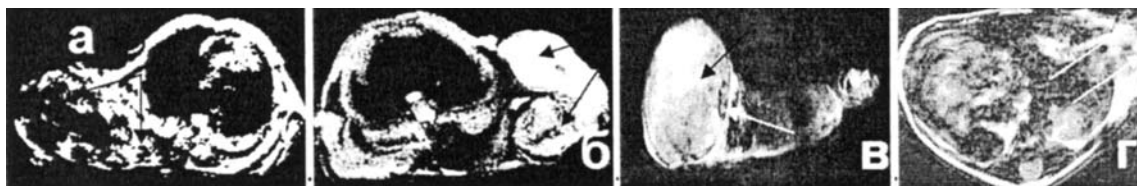


Рис. 3. (а, б, в, з). Усиленное наночастицами дестранферрита МР-изображение при T_2 -взвешенном градиент-эхо (500/15) поперечном сканировании тела мыши с МР-изображениями опухолей: а) лимфоцитарный лейкоз Р388 (солидная форма); б) карцинома Эрлиха; в, з) карцинома легких Льюис (стрелки). Исследования проведены в ЦМТС МГУ им. М. В. Ломоносова на биоспектротомографе BIOSPEC BC 70/30 USR (Bruker).

Аналогично приготовили 60 мышей с карциномой Эрлиха, привитой под кожу правой лопатки; 30 мышей с карциномой Льюис, привитой в мышцу правого бедра; и 30 мышей с карциномой Льюис, привитой под кожу правой лопатки. Мышей с привитыми опухолями разделили на 4 группы: 1-я, 2-я, 3-я и 4-я. В 1-ю контрольную группу входило 20 мышей, во 2-ю, 3-ю и 4-ю группы — по 10 мышей в каждой.

МРТ мышей провели в ЦМТС МГУ им. М. В. Ломоносова на биоспектротомографе BIOSPEC BC 70/30 USR (Bruker) в режимах T_1 -взвешенных {500/15 [время повторения, мс/время эхо, мс]} и T_2 -взвешенных (1900/80) спин-эхо и T_2 -взвешенных градиент-эхо (500/15)} последовательностей.

Измерили интенсивность сигнала и провели визуальный анализ структуры опухоли и внутренних органов (лимфатические узлы, кости, лёгкие, почки, мочевой пузырь и печень), которые поражаются макро- и микро-метастазами лимфоцитарного лейкоза Р388, карциномы Эрлиха и карциномы лёгких Льюис.

Через 24 ч МРТ повторили. За 15 мин до повторения МРТ в хвостовую вену мышей вводили от 6 до 10 мкл магневиста или дотарема и проводили T_2 -взвешенные градиент-эхо (ГРЭ) (500/15) последовательности. Измерили повышение интенсивности сигнала, провели визуальный анализ структуры опухолей и границ инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, проверили внутренние органы на содержание макро- и микро-метастазов.

За 24–30 ч до третьего опыта МРТ в хвостовую вену мышей вводили 10–100 мкл 1 % золя ДФ (наночастицы диаметром 240 нм; до 2,02 мг Fe/кг) с последующим проведением T_2 -взвешенного ГРЭ сканирования. Определяли понижение интенсивности сигнала и проводили визуальный анализ структуры опухолей и границ инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, проверили внутренние органы на содержание макро- и микро-метастазов. Для подтверждения обнаруженных при МРТ макро- и микро-метастазов сравнивали результаты МРТ, визуальных и гистопатологических данных. Подтвержденные данные о наличии макро- и микро-метастазов использовали для коррекции планов МТХТ опухолей.

Первый опыт МТХТ провели на 50 выбранных мышцах, когда объем опухолей достиг 100–120 мм³. 1-я (контрольная) группа из 20 мышей 6 раз получала 300 мкл 0,9 % раствора хлорида натрия в виде внутриопухолевых инъекций с интервалом 3 сут. 2-я груп-

па (10 мышей) 6 раз получала 300 мкл раствора, содержащего 0,1 мг ЦФ, в виде внутриопухолевых инъекций с интервалом 3 сут.

Магнитоуправляемый 30 % золь (300 мкл), полученный на основе ДФ и ЦФ (содержание $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ и Fe_3O_4 25,2 мг; ЦФ 0,1 мг; рН 6,6; $\zeta + 15$ мВ; M_s 7,8 кА/м; УАЭ 240 Вт/г Fe), тонкой иглой вводили в опухоль и окружающие ткани мышей 3-й и 4-й групп.

Регионарную МТХТ осуществляли в ПеМП (частота 0,88 МГц, индукция 7,2 кА/м, мощность 0,15 кВт), генерированном катушкой индуктивности, снабженной водяной рубашкой. Слой воды толщиной 2 мм, циркулирующей внутри рубашки, имел температуру +37 °С. Температура поверхности кожи, покрывающей опухоль, повышалась до +44 °С и поддерживалась на этом уровне с точностью около ± 1 °С. В центре опухоли температура была выше 45 °С. Клетки в этом районе опухоли некротизировались, некротические массы с остатками МПП отсасывали, на их месте вырастала соединительная ткань (рис. 8).

Для усиления магнитогидродинамического взаимодействия наночастиц с клетками в 3-й и 4-й группах сразу после введения золя его концентрировали в опухолевой ткани 3–6 мин в неоднородном постоянном магнитном поле (НПМП) путем размещения мышей в центре постоянного SmCo_5 магнита (50 × 50 × 20 мм, индукцией 0,2 Тл, градиент на поверхности магнита 0,015 Тл/см) [6, 28, 29]. Термохимическое взаимодействие наночастиц с клетками осуществляли согласно [2, 7, 10]. Внутриканевую концентрацию ДФ в опухоли определяли у мышей по методу [12], концентрацию ЦФ устанавливали хроматографически по аналогии с сарколизинном [14].

Каждую мышью 3-й и 4-й групп сразу после концентрирования введенного МПП в опухоли помещали в непроводящие электрический ток оболочки, которые размещали в водяной рубашке [3–4, 23, 28, 35], расположенной в катушке индуктивности (внутренний диаметр 60 мм; длина 200 мм; 0,88 МГц, 7,2 кА/м, 0,15 кВт). Через рубашку пропускали воду из проточного термостата (температура +37 °С) и включали генератор ПеМП. Одновременно с индукционным нагревом измеряли температуру опухоли и тела животного [3, 7, 35]. МТХТ проводили 3 раза по 30 мин с 3 дневными интервалами в 3-й группе и 6 раз в 4-й группе; в 3-й и 4-й группах МТХТ сопровождалась отсасыванием некротических масс (ОНМ) из опухоли (МТХТ-ОНМ). Мышам 4-й группы, у которых были

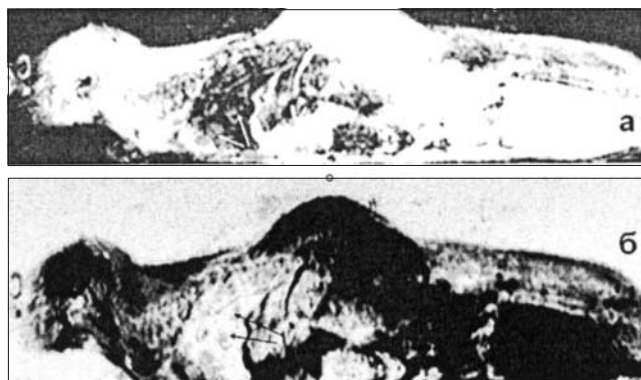


Рис. 4. (а, б). Усиленные наночастицами декстранферрита МР-изображения границ инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, макро- и микро-метастазов карциномы легких Льюис (стрелки). (а) Позитивное изображение, T_2 взвешенное градиент-эхо (ГЭ) (500/15) продольное сканирование тела мыши с карциномой легких Льюис, привитой под кожу правой лопатки; (б) негативное изображение того же слоя. Число метастазов, обнаруживаемых при МРТ, часто в 2 раза превышало число метастазов, обнаруживаемых на поверхности легких визуально. Исследования проведены в ЦМТС МГУ им. М. В. Ломоносова на биоспектротомографе BIOSPEC BC 70/30 USR (Bruker).

обнаружены макро- и микро-метастазы, дополнительно вводили в хвостовую вену по 2 мкл раствора, содержащего 0,1 г ЦФ.

Второй эксперимент МТХТ-ОНМ провели через 6 дней. Мышей с опухолями объемом от 300 до 360 мм³ выбрали и разделили на 4 группы: 1'-я — 20 мышей, 2'-я, 3'-я и 4'-я по 10 мышей в каждой. После этого повторили первый эксперимент в 1'-й и 2'-й группах. МТХТ-ОНМ провели 3 раза по 30 мин с 3 дневными интервалами в 3'-й группе и 6 раз в 4'-й группе и, кроме того, в 4'-й группе в метастазы и в хвостовую вену мышей вводили 0,2 мл раствора, содержащего 0,1 г ЦФ.

Оценку противоопухолевой активности проводили согласно [42], статистический анализ — согласно [43].

Результаты и их обсуждение

ДФ № 362 представляет собой темно-коричневые пластинки, содержащие около 26 % $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ и Fe_3O_4 , 72 % декстрана и 2 % воды. Удельная намагниченность насыщения (σ) декстранферрита 17 А · м²/кг, 30 % золь ДФ имеет темно-коричневую окраску, рН 6,6, $\zeta + 15$ мВ, M_s 7,8 кА/м; УАЭ 240 Вт/г Fe. По результатам просвечивающей электронной микроскопии золь ДФ на электронном микроскопе Филипс EM400 установили, что диаметр кристаллического ядра составляет 6 – 12 нм (рис. 1).

Дисперсная фаза полученных золь ДФ представлена мицеллами, имеющими форму микросфер, диаметром 200 – 240 нм (рис. 2). Результаты Gaussian/Nicomr анализа распределения частиц по величине их диаметров в 0,001 % золе ДФ представлены на рис. 2.

Полученные золи ДФ индукционно нагреваются в ПеМП (0,88 МГц, 7,2 кА/м, 0,15 кВт) со скоростью до 2 °С/мг Fe мин. Полученные растворы ЦФ проявляют устойчивость к гравитации, магнитным полям и лио-



Рис. 5. Усиленное наночастицами декстранферрита МР-изображение при T_2 взвешенном градиент-эхо (500/15) поперечном сканировании мыши BDF₁ с карциномой легких Льюис, инвазия опухолевых клеток и микрососудов во внутренние органы (черные стрелки) макро- и микро-метастазы в печени и других внутренних органах (белые стрелки). Исследования проведены в ЦМТС МГУ им. М. В. Ломоносова на биоспектротомографе BIOSPEC BC 70/30 USR (Bruker).

филизации. Намагниченность насыщения (M_s) разработанного смешанного золя ДФ и ЦФ зависит от состава и была равна 7,8 – 8,4 кА/м; рН 6,6 – 7,4; ζ до + 15 мВ; УАЭ 240 Вт/г Fe.

При внутрисосудистом введении золь ДФ проникновение наночастиц ДФ в опухоли и метастазы затруднено из-за ограниченного кровоснабжения, связанного с атипичным строением сосудов и повышенным внутриопухолевым давлением. Концентрация ДФ в опухоли и метастазах повышается медленно, в нормальных тканях — быстро. Из-за этого увеличивается разность между величинами сигналов от опухолевых и нормальных тканей, усиливающая контраст МР-изображений. Усиление контраста МР-изображений биологических тканей *in vivo* наночастицами ДФ свидетельствует о вариабельности структуры первичных опухолей (рис. 3), инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, наличии макро- и микро-метастазов (рис. 4 – 6).

Усиление контраста МР-изображений биологических тканей *in vivo* наночастицами ДФ позволило обнаружить границы инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, макро- и микро-метастазы внутренних органов мышей (рис. 4), которые были подтверждены визуальными и гистопатологическими исследованиями. Визуальное и гистопатологическое подтверждение наличия макро-метастазов явилось основанием для внесения существенных поправок при планировании интенсивности и объема МТХТ в 4-й и 4'-й группах.

На рис. 6 видно гетерогенное строение печени (а); отдельные макро- и микро-метастазы видны нечетко (б); отдельные макро- и микро-метастазы видны нечетко, гроздь макро- и микро-метастазов представлены в виде белых пятен (в); границы инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, отдельные макро- и микро-метастазы и их гроздь видны четко (г, д, е).

Во 2-й и 2'-й группах мышей через 10 мин после первой инъекции ЦФ в опухолевой ткани обнаружено от 1 до 2 % ЦФ, который определили методами хроматографии [14]. От 26 до 42 % введенного ДФ и от 19 до 21 % ЦФ определяется в опухолевой ткани 3-й,

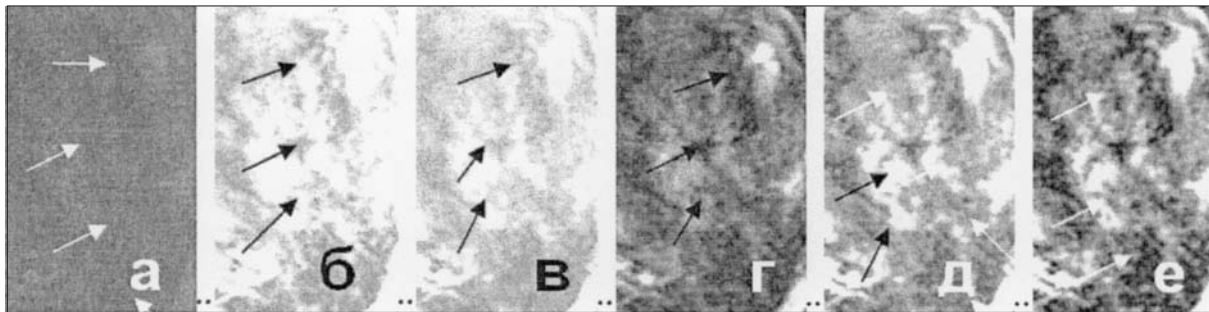


Рис. 6. (а, б, в, г, д). Слой печени с множественными макро- и микро-метастазами: (а) до контрастирования; (б) контрастирование магнестомом; (в) контрастирование дотаремом; (г) контрастирование декстранферритом; (д) контрастирование декстранферритом в сочетании с магнестомом; (е) контрастирование декстранферритом в сочетании с дотаремом. Исследования проведены в ЦМТС МГУ им. М. В. Ломоносова на биоспектротомографе BIOSPEC BC 70/30 USR (Bruker).

3'-й, 4-й и 4'-й групп мышей после первой инъекции МПП с последующим его концентрированием НПМП. После включения генератора ПеМП температура опухоли в 3-й, 3'-й и 4-й, 4'-й группах повышается и через 9 мин достигает +44 °С, температура внутри опухоли продолжает постепенно подниматься выше +45 °С. У некоторых мышей наблюдаются признаки перегрева кожи, покрывающей опухоль. Если сеанс МТХТ продолжается 33 мин, то температура кожи, покрывающей опухоль, превышает +45 °С, и у некоторых мышей появляются признаки ожога кожи. Поэтому процедура МТХТ в последующих опытах продолжалась не более 30 мин. В противоположность этому температура в прямой кишке и в опухоли без ДФ остается между 37 и 40 °С.

В 1-й и 1'-й группах объем опухоли у каждой мыши устойчиво увеличивается без признаков регрессии. Во 2-й и 2'-й группах объем опухоли у каждой мыши уменьшается до 30 дня от начала лечения и далее он медленно увеличивается. В 3-й, 3'-й группах объем опухоли у каждой мыши уменьшается до 40 дня от начала лечения и далее он медленно увеличивается, в противоположность этому, в 4-й, 4'-й группах объем опухоли уменьшается с 1 по 25 день и остается на том же уровне до 90 дня. Полная регрессия опухолей наблюдается у 4 мышей 4-й группы. В процессе полной регрессии на месте опухоли образуется короста, после отслоения коросты остается лысина, постепенно зарастающая седой шерстью, при этом в течение 3 мес не наблюдается рецидивов опухоли (рис. 7).

Результаты гистопатологического исследования опухолевых тканей представлены на рис. 8: (а) наночастицы ДФ, сконцентрированные в опухоли, под действием НПМП и ферментов превращаются в конгломераты; (б) после первой процедуры индукционного нагрева опухоли имеет место частичное разрушение сосудистой стенки и проникновение некротических масс, содержащих конгломераты ДФ, в сосудистое русло (стрелки); (в) после 3 процедур МТХТ-ОНМ отмечается уменьшение числа внутри- и внеклеточных конгломератов ДФ и частичное замещение опухолевых клеток соединительной тканью, отдельные опухолевые клетки, расположенные по периферии опухоли, вы-

жили (стрелки); (г) после 6 процедур МТХТ-ОНМ наблюдается полное истощение опухолевых клеток и разрастание на месте опухоли соединительной ткани (неокрашенные пятна).

Усиление контраста МР-изображений биологических тканей *in vivo* наночастицами ДФ способствовало обнаружению границ инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, макро- и микро-метастазов в легких, почке и мочевом пузыре мышей (рис. 9, а – в, стрелки). Обнаружение границ инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, макро- и микро-метастазов на ранней стадии канцерогенеза явилось основанием для введения ЦФ в метастазы и в хвостовую вену, что позволило значительно увеличить продолжительность жизни мышей с карциномой легких Льюис.

На рис. 9, а – в, представлены МР-изображения метастазов карциномы легких Льюис. Усиление МР-изображений наночастицами ДФ позволило обна-

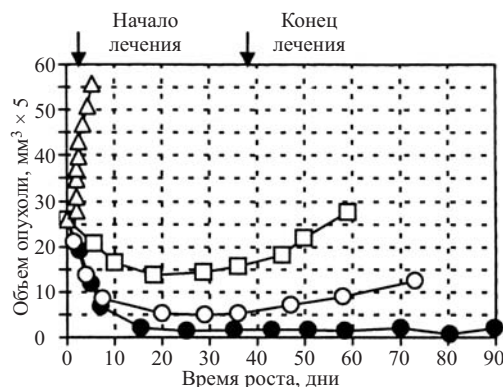


Рис. 7. Объем опухолей солидной формы лимфоцитарного лейкоза P388 у мышей BDF₁: Δ — контрольные животные после внутриопухолевых инъекций 300 мкл 0,9 % раствора хлорида натрия (1-я группа); □ — после 6 внутриопухолевых инъекций циклофосфамида (ЦФ, 2-я группа); ○ — после 3 процедур МТХТ-ОНМ, включающих внутриопухолевые инъекции ДФ-ЦФ, концентрирование в НПМП с последующей гипертермией и отсасыванием некротических масс (3-я группа); ● — после 6 процедур МТХТ-ОНМ-ЦФ, включающих внутриопухолевые инъекции ДФ-ЦФ, концентрирование в НПМП с последующей гипертермией, отсасыванием некротических масс и введением циклофосфамида в метастазы и в хвостовую вену (4-я группа). Исследования проведены в НИИ ЭД и ТО ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

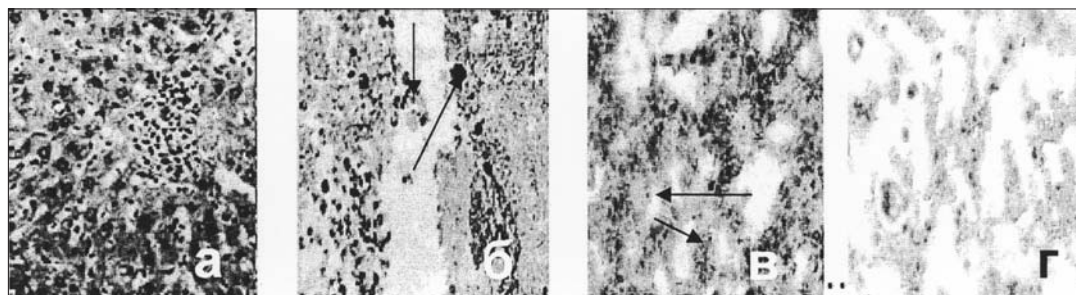


Рис. 8. (а, б, в, з). Микрофотографии гистопатологических препаратов солидной формы опухоли Р388, на которых интенсивно окрашены Берлинской лазурью только опухолевые клетки и ядра, содержащие феррит, увеличение 10×20 : (а) сразу после концентрации ДФ в опухоли; (б) после первой процедуры индукционного нагревания опухоли виден выход конгломератов феррита в просвет сосуда; (в) после 3 процедур МТХТ-ОНМ; (з) после 6 процедур МТХТ-ОНМ с введением циклофосфида в метастазы и в хвостовую вену. Исследования проведены в НИИ ЭД и ТО ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

ружить границы инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, макро- и микро-метастазы мочевого пузыря, легких и почки, которые не пальпировались, не выявлялись при диагностике физическими методами и были невидимы до повышения контраста МР-изображений. Полученные результаты позволили объективно планировать интенсивность МТХТ.

Значительное уменьшение размеров опухолей наблюдается после 3 процедур МТХТ-ОНМ в 3-й группе и полная регрессия опухолей — после 6 процедур МТХТ-ОНМ в 4-й группе по сравнению с контрольной 1-й группой, в которой МТХТ не проводилась, и

со 2-й группой, в которой МТХТ не проводилась, но вводился ЦФ (рис. 7, табл. 1, 2).

Через 2 мес после окончания лечения у животных, не получавших МТХТ или получивших только 3 процедуры МТХТ, обнаружены множественные инвазии опухолевых клеток, неоваскуляризация, макро- и микро-метастазы в здоровые ткани и органы, из-за которых часть животных потеряла подвижность, оставшиеся животные передвигались с трудом, все процессы, обеспечивающие жизнеспособность, были затруднены. Их внутренние органы были поражены макро- и микро-метастазами (рис. 3 – 5, 9, а – в).

В табл. 1 представлены средние и относительные объемы опухолей, уровни полной регрессии и среднего увеличения продолжительности жизни (УПЖ) мышей на 36 день после конечной процедуры МТХТ, включающей внутриопухолевые инъекции ДФ-ЦФ, концентрирование ДФ-ЦФ неоднородным постоянным магнитным полем в опухоли и последующий нагрев опухолевых тканей в ПеМП. Во 2-й группе МТХТ не проводилась, поэтому уменьшение среднего объема опухолей было незначительным (УПЖ — 60 %). Уменьшение размеров опухолей наблюдается в 3-й группе (УПЖ — 90 %). В 4-й группе после 6 процедур МТХТ-ОНМ с введением ЦФ в хвостовую вену отмечается полная регрессия опухолей у 40 % животных, УПЖ составляет 310 % (срок наблюдения 90 дней).

В табл. 2 приведены средние и относительные объемы опухолей и средние значения УПЖ мышей на 36 день после конечной процедуры МТХТ, включающей внутриопухолевые инъекции ДФ-ЦФ, концентрирование ДФ-ЦФ неоднородным постоянным магнитным полем в опухоли и последующий нагрев опухолевых тканей в ПеМП. В 2'-й группе МТХТ проводилась без концентрирования ДФ-ЦФ, поэтому уменьшение среднего объема опухолей незначительно (УПЖ 40 %). Существенное уменьшение размеров опухолей наблюдается в 3'-й группе (УПЖ 80 %). В 4'-й группе после 6 процедур МТХТ-ОНМ с введением ЦФ в метастазы и в хвостовую вену опухоли не обнаруживаются (УПЖ 220 %). В течение 3 мес после полной регрессии опухолей рецидивы отсутствуют у 1 из 10 мышей в 4'-й группе. После регрессии первичных



Рис. 9. (а, б, в) карцинома легких Льюис: (а) усиленные декстраниферритом МК-изображения метастазов карциномы легких Льюис стрелки в легких, почке и мочевом пузыре; (б) опухоль перед лечением (короткая стрелка), неоваскуляризация и метастазы в легких (длинная стрелка); (в) остатки карциномы легких Льюис после первой процедуры МТХТ-ОНМ (короткая стрелка); быстрое (в течение 3 дней) увеличение неоваскуляризации и метастазов в легких после удаления части опухоли (длинная стрелка). Исследования проведены в ЦМТС МГУ им. М. В. Ломоносова на биоспектротомографе BIOSPEC BC 70/30 USR (Bruker).

Таблица 1

Противоопухолевый эффект магнитогидродинамической термомиотерапии (МТХТ) на ткани солидной подкожной формы лимфоцитарного лейкоза P388 через 36 дней после первой процедуры МТХТ, полная регрессия опухолей и среднее увеличение продолжительности жизни (УПЖ) самок мышей линии BDF₁

| Группа | Число процедур | Средний объем опухоли, мм ³ | Относительный* объем опухоли, мм ³ | Полная регрессия опухоли, % | УПЖ, % |
|--------|----------------|--|---|-----------------------------|--------|
| 1-я | 0 | 110 ± 71,0 | 1,000 | 0 | 0 |
| 2-я | 0 | 71,20 ± 22,0 | 0,650 | 0 | 60 |
| 3-я | 3 | 20,30 ± 6,0 | 0,190 | 0 | 90 |
| 4-я | 6 | 4,80 ± 1,3 | 0,044 | 40 | 310 |

* Относительный объем опухоли = (средний объем опухоли каждой группы)/(средний объем опухоли 1-й группы).

опухолей и подкожных метастазов на их месте остаются коросты и алопеции, которые постепенно зарастают седой шерстью.

Полученные результаты подтверждают преимущества МТХТ-ОНМ-ЦФ опухолей перед известными способами гипертермии.

Для достижения полной регрессии солидной опухоли лимфоцитарного лейкоза P388 необходимы: многократные инъекции золя ДФ, содержащего ЦФ, с его последующим концентрированием в тканях опухоли НППМ и МТХТ. В группах с применением концентрирования зольей, содержащих ДФ-ЦФ, в опухолевых тканях в сочетании с повторяющимися процедурами МТХТ-ОНМ и введением ЦФ в метастазы и в хвостовую вену число мышей с полной регрессией опухолей и продолжительность их жизни возрастает. К преимуществам данного способа терапии опухолей можно отнести:

– более глубокое проникновение радиочастотного поля (0,88 МГц) в ткани опухоли по сравнению с проникновением электромагнитных излучений лазерного диапазона;

– увеличение числа мышей с полной регрессией опухолей до 40 %;

– удлинение продолжительности их жизни до 310 %;

– торможение метастазирования.

Внутривенное введение ДФ за 24 – 30 ч до проведения МРТ повышает контраст органов и тканей, усиливает МР-изображения и способствует обнаружению границ инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани, макро- и микро-метастазов. Внутриопухолевое введение ДФ-ЦФ, сопровождаемое его концентрированием в опухолевых тканях НППМ, приводит к увеличению концентрации ДФ в опухоли до 60 %, ЦФ — до 30 %. Последующий индукционный нагрев ДФ-ЦФ в ПемП с отсасыванием некротических масс и введением ЦФ в метастазы и в хвостовую вену приводит к полной регрессии опухолей лимфоцитарного лейкоза P388 у 40 % самок мышей BDF₁ и к 310 % УПЖ при объеме исходных опухолей 100 – 120 мм³. При объеме исход-

Таблица 2

Противоопухолевый эффект магнитогидродинамической термомиотерапии (МТХТ) на ткани солидной подкожной формы лимфоцитарного лейкоза P388 через 36 дней после первой процедуры МТХТ и среднее увеличение продолжительности жизни (УПЖ) самок мышей линии BDF₁

| Группа | Число процедур | Средний объем опухоли, мм ³ | Относительный* объем опухоли, мм ³ | УПЖ, % |
|--------|----------------|--|---|--------|
| 1-я | 0 | 330,20 ± 141,0 | 1,000 | 0 |
| 2-я | 0 | 240,40 ± 80,0 | 0,730 | 40 |
| 3-я | 3 | 110,20 ± 40,0 | 0,330 | 80 |
| 4-я | 6 | 30,10 ± 9,0 | 0,091 | 220 |

* Относительный объем опухоли = (средний объем опухоли каждой группы)/(средний объем опухоли 1-й группы).

ных опухолей 300 – 360 мм³ наблюдается УПЖ мышей до 220 %.

Работа проводилась при финансовой поддержке РФФИ 05-01-00839 и РФФИ 05-03-08215.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. А. Брусенцов, *Ж. всец. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева*, **35**, 759 – 766 (1990).
2. A. Jordan, P. Wust, R. Scholz, et al., *Scientific and Application of Magnetic Carriers*, Hafeli, et al. (eds.), Plenum Press, New York (1997), pp. 569 – 578.
3. Н. А. Брусенцов, А. Ю. Барышников, Т. Н. Брусенцова и др., Патент РФ № 2203111, *Бюл. изобрет.*, № 12 (2003).
4. Н. А. Брусенцов, Т. Н. Брусенцова, *Сб. науч. трудов 12-й Международной плесской конф. по магнитным жидкостям*, Плес (2006), сс. 272 – 285.
5. Н. А. Брусенцов, Т. Н. Брусенцова, Е. Ю. Филинова и др., *Сб. науч. трудов 12-й Международной плесской конф. по магнитным жидкостям*, Плес (2006), сс. 286 – 295.
6. N. A. Brusentsov, T. N. Brusentsova, E. Yu. Filinova, et al., *6th Int. Conf. Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Krems, Austria (2006), p. 110.
7. N. A. Brusentsov, L. V. Nikitin, T. N. Brusentsova, et al., *J. Mag. Magn. Mat.*, **252**, 378 – 380 (2002).
8. N. A. Brusentsov, V. V. Gogosov, T. N. Brusentsova, et al., *J. Magn. Mater.*, **225**, 113 – 117 (2001).
9. O. A. Kuznetsov, N. A. Brusentsov, A. A. Kuznetsov, et al., *J. Magn. Mater.*, **194**, 83 – 89 (1999).
10. Н. А. Брусенцов, *Ж. всец. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева*, **32**(5), 562 – 569 (1987).
11. Н. А. Брусенцов, В. В. Лыков, *Ж. всец. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева*, **34**(5), 566 – 572 (1989).
12. А. Б. Сыркин, С. Ф. Юшков, Ю. Н. Бульчев и др., *Эксперим. онкология*, **12**, 71 – 72 (1990).
13. Н. А. Брусенцов, В. В. Гогосов, М. В. Лукашевич, *Хим.-фарм. журн.*, **30**(10), 48 – 53 (1996).
14. Н. А. Брусенцов, *Ж. всец. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева*, **36**(3), 553 – 555 (1991).
15. Н. А. Брусенцов, Т. Ю. Глазкова, Н. П. Яворская, *Эксперим. онкология*, **12**(6), 59, 60 (1990).
16. В. Н. Митин, Н. А. Брусенцов, *Тез. докладов 4-й Всесоюзной конференции по магнитным жидкостям*, Иваново (1985), т. 1, сс. 218, 219.
17. N. A. Brusentsov, L. Kh. Komissarova, A. A. Kuznetsov, et al., *J. Eur. Cells Materials*, **3**(Supl. 2), 70 – 73 (2002).
18. А. В. Сувернев, А. А. Писарев, А. Н. Пенягин и др., Патент РФ № 2126667, *Бюл. изобрет.*, № 6 (1999).
19. Т. Н. Брусенцова, В. Д. Кузнецов, *Сб. научн. трудов 12-й Международной плесской конф. по магнитным жидкостям*, Плес (2006), сс. 97 – 103.

20. Т. Н. Брусенцова, В. Д. Кузнецов, *Мед. физика*, **3**(27), 58 – 68 (2005).
21. N. A. Brusentsov, T. N. Brusentsova, A. Yu. Baryshnikov, et al., *Biocatalytic Technology and Nanotechnology*, G. E. Zaikov (ed.), Nova Science Publishers, Inc., (2004), pp. 59 – 63.
22. Т. Н. Брусенцова, В. А. Полянский, В. Д. Кузнецов, *Сб. науч. трудов 11-й Международной плесской конф. по магнитным жидкостям*, Плес (2004), сс. 239 – 241.
23. Н. А. Брусенцов, Т. Н. Брусенцова, А. Ю. Барышников, *Сб. науч. трудов 11-й Международной плесской конф. по магнитным жидкостям*, Плес (2004), сс. 242 – 247.
24. Н. А. Брусенцов, Т. Н. Брусенцова, А. Ю. Барышников, *Сб. науч. трудов 11-й Международной плесской конф. по магнитным жидкостям*, Плес (2004), сс. 248 – 253.
25. Н. А. Брусенцов, А. Ю. Барышников, Т. Н. Брусенцова, *Сб. науч. трудов 11-й Международной плесской конф. по магнитным жидкостям*, Плес (2004), сс. 258 – 267.
26. N. A. Brusentsov, V. D. Kuznetsov, and T. N. Brusentsova, *J. Mag. Magn. Mat.*, **252**, 2350 – 2351 (2004).
27. Н. А. Брусенцов, Т. Н. Брусенцова, В. А. Полянский, Патент РФ № 2236688, *Бюл. изобрет.* № 26 (2004).
28. C. Mikkelsen, M. F. Hansen, and H. Bruus, *J. Mag. Magn. Mat.*, **293**, 587 – 590 (2005).
29. N. A. Brusentsov, T. N. Brusentsova, E. Yu. Filinova, et al., *J. Mag. Magn. Mat.*, **253**, 450 – 454 (2005).
30. T. N. Brusentsova, N. A. Brusentsov, et al., *J. Mag. Magn. Mat.*, **253**, 298 – 302 (2005).
31. Н. А. Брусенцов, А. А. Шевелев, Т. Н. Брусенцова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **36**(3), 8 – 10 (2002).
32. T. N. Brusentsova and V. D. Kuznetsov, *6th Int. Conf. Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Krems, Austria (2006), p. 111.
33. M. Johannsen, U. Gneveckow, L. Eckelt, et al., *Int. J. Hyperthermia*, **21**, 637 – 647 (2005).
34. A. Jordan, R. Scholz, K. Maier-Hauff, et al., *J. Magn. Magn. Mater.*, **225**, 118 – 126 (2001).
35. Н. А. Брусенцов, Т. Н. Брусенцова, А. В. Сергеев и др., *Хим.-фарм. журн.*, **34**(4), 38 – 44 (2000).
36. N. A. Brusentsov, V. N. Nikiforov, T. N. Brusentsova, et al., *Moscow international symposium on magnetism, Books of Abstracts*, Moscow (2005), pp. 645 – 646.
37. A. A. Kuznetsov, O. A. Shyakhtin, O. A. Kuznetsov, et al., *J. Eur. Cells Materials*, **3**(2), 75 – 77 (2002).
38. A. A. Kuznetsov, V. A. Brukvin, N. A. Brusentsov, et al., *5th Int. Conf. Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Lyon, France (2004), p. 49.
39. VIDAL, *Видаль специалист, онкология, изд. 2*, АстраФарм-Сервис, Москва (2004), сс. 414, 415.
40. P. C. Lauterbur, *Nature*, **242**, 190, 191 (1973).
41. Н. А. Брусенцов, *Медицинская биофизика, Биологические испытания химических соединений*, Медицина, Москва (2005), сс. 123 – 125.
42. Л. Ф. Ларионов, *Химиотерапия злокачественных опухолей*, Мед. лит., Москва (1962).
43. О. Ю. Реброва, *Статистический анализ медицинских данных*, Медиа Сфера, Москва (2002).

Поступила 25.12.06

MAGNETOHYDRODYNAMIC THERMOCHEMOTHERAPY OF MALIGNANT TUMOR USING NANOPREPARATIONS WITH MAGNETIC-RESONANCE MONITORING

N. A. Brusentsov^{1, 2}, T. N. Brusentsova², E. Yu. Filinova³, Y. A. Pirogov⁴, D. A. Kupriyanov⁴, A. I. Dubina⁴, M. N. Shumskikh⁴, L. I. Shumakov⁵, N. Y. Jurchenko¹, E. N. Anashkina¹, and A. A. Shevelev¹

¹ Blokhin Oncological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia;

² Institute of Mechanics, Moscow State University, Moscow, 117192 Russia;

³ Noncommercial Organization "Advanced Biomedical Research Laboratory", Moscow, 115446, Russia;

⁴ Center for Magnetic Tomography and Spectroscopy, Moscow State University, Moscow 119992, Russia;

⁵ State Radio Engineering Research Institute, Moscow, Russia

Dextran-ferrite (DF) sol enhances magnetic-resonance (MR) images obtained by T₂-weighted gradient-echo (GRE) (500/15 sequences) scanning with visualization of the boundaries of tumor cell invasion into healthy tissues for macro- and micrometastases of lymphocyte leucosis P388 and the Ehrlich and Lewis carcinomas. After the magnetohydrodynamic thermochemotherapy (MTC) with fluid containing cyclophosphamide (CP) and DF sol (M, 8.6 kA/m, pH 7.4, ζ + 13 mV) at 46°C for 30 min under AC magnetic field (0.88 MHz, 7.3 kA/m, 0.15 kW) with tumor slime aspiration (TSA), the regression of P388 tumor (~110 mm³) in BDF1 mice before metastases was 40% and an increase in the life span (ILS) achieved 310%; for large tumors (~330 mm³) after metastases, the MTC-TSA and cyclophosphamide treatment yielded an ILS of 220%.