

УДК 621.318.4:616

МЕХАНОМАГНІТНИЙ РЕАКТОР ДЛЯ АКТИВАЦІЇ ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ

В. Е. Орел^{1, 2}О. Ю. Рихальський^{1, 2}А. Д. Шевченко³Ю. А. Кондратова⁴А. П. Бурлака⁵С. М. Лукін⁵І. Б. Щепотін¹¹Національний інститут раку МОЗ України, Київ²Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»³Інститут металофізики ім. Г. В. Курдюмова НАН України, Київ⁴ПАТ «Фармак», Київ⁵Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кравецького НАН України, Київ

E-mail: v-orel@voliacable.com

Отримано 01.08.2013

Використання механомагнітохімічної активації дає змогу підвищити концентрацію парамагнітних центрів (вільних радикалів) у протипухлинному препараті, наприклад доксорубіцині, що уможливорює безпосередній вплив на його магнітні властивості під дією зовнішнього електромагнітного поля і, як результат, поліпшення магнітної чутливості та протипухлинної активності. У роботі викладено принципи конструкції та роботи механомагнітного реактора для реалізації цієї технології, що полягає у комбінації впливу механомагнітохімічної активації та електромагнітного опромінення. Досліджуючи вплив механомагнітохімічної активації на доксорубіцин, використовували методи вібраційної магнітометрії, спектроскопії електронного парамагнітного резонансу та високо-ефективної рідинної хроматографії.

Результати проведених досліджень показали, що в конструкції механомагнітного реактора доцільно використовувати генератор електромагнітного поля із синусоїдальною формою сигналу, робочі камери з капролактану, фторопласту або з органічних матеріалів із металевими вставками, а також робочі тіла зі сталі або агату залежно від необхідних магнітних властивостей доксорубіцину. Під впливом механомагнітохімічної активації доксорубіцину, який є діаманетиком, набуває властивостей парамагнетика, не змінюючи розподілу g-фактора у спектрах електронного парамагнітного резонансу. Одержані результати свідчать про перспективу використання технології механомагнітохімічної активації доксорубіцину в терапії злоякісних новоутворень, зокрема її цілеспрямованого застосування у разі нанорозмірних магнітних структур та зовнішнього електромагнітного опромінення.

Ключові слова: вільні радикали, доксорубіцин, механомагнітохімічна активація.

Експериментальні та клінічні дослідження, що їх здійснено за останнє десятиріччя, свідчать про перспективу використання як протипухлинних препаратів магніточутливого наноконструксу (НК) на основі наночастинок оксидів заліза магнетиту (Fe_3O_4) і протипухлинного антибіотика антрациклінового ряду доксорубіцину (ДР) [1, 2].

Найпоширеніші способи синтезу НК — окиснення, хемосорбція на поверхні наночастинок, спрямована модифікація поверхні, термоліз, механохімічна активація тощо. Для підвищення стійкості колоїдної системи в розчині та біосумісності ядра наночастинки оксиду заліза покривають органічною речовиною для зв'язування за допомогою електростатичних (іонних) зв'язків з ДР. Тому модифікований поверхневий шар НК може мати зовсім інші магнітні характеристики, ніж ядро, що може спричинити знач-

ні зміни фізико-хімічних характеристик препарату [3].

У раніше проведених пілотних дослідженнях було показано, що механохімічно активований ДР у комбінації з електромагнітним опроміненням за фізіологічних температур має значно вищий протипухлинний ефект, ніж офіційний препарат, унаслідок утворення додаткових цитотоксичних вільних радикалів [4]. На основі цього було розроблено технологію механомагнітохімічної активації (ММХА) наночастинок Fe_3O_4 і ДР, що полягає у комбінації впливу механохімічної активації та електромагнітного опромінення композиту магнітних мікро- і наночастинок та протипухлинного препарату [5]. Використання цієї технології сприяє підвищенню концентрації парамагнітних центрів (вільних радикалів) у препараті, що дає змогу безпосередньо впливати на

магнітні властивості ДР під дією зовнішнього електромагнітного поля та поліпшувати його магнітну чутливість. Це, у свою чергу, уможливорює краще цілеспрямоване доставлення препарату в пухлину та підвищення його ефективності.

У першому варіанті приладу для активації та створення наноконструкції було використано механомагнітний реактор на базі лабораторного мікробромліна ММВЕ-0.005 (Гефест, Росія). Однак його конструкція мала низку недоліків. По-перше — недостатня точність встановлення частоти вібрації та амплітуди коливань. По-друге — невелика надійність пристрою внаслідок застосування механічного принципу коливань. Окрім того, робочі камери та робочі тіла не були оптимальними з погляду максимізації магнітної чутливості НК під час ММХА.

У роботі описано модернізований механомагнітний реактор і проведено дослідження матеріалів робочих тіл та камер, що їх використовують за ММХА, а також зміни фізико-хімічних властивостей ДР, який є протипухлинною субстанцією в НК.

Матеріали і методи

ММХА наноконструкції проводили за допомогою модифікованого механомагнітного реактора (рис. 1) на базі медичного мікробромліна для механохімічної модифікації лікарських засобів «Лотос-3» («Лотос», Україна), в якому використано лінійний двигун [6]. Механомагнітний реактор складається з таких структурних блоків: механохімічного реактора (мікробромліна), постійних магнітів, індуктора, ВЧ-генератора, частотомера, робочої камери та робочих тіл.

В реакторі було використано й досліджено робочі камери трьох типів і два типи робочих тіл, які зображено на рис. 2.

Як матеріали робочих камер для механомагнітного реактора застосовували капролактан (Quadrant, Бельгія), фторопласт Ф-4 («ЗАТ Фторопластовые технологии», Росія) та нержавіючу сталь 12Х18Н19Т. Робочими тілами слугували кульки з нержавіючої сталі марки 1.4112 та з агату (Retsch, Німеччина). Сталеві кульки мали твердість 55–57 HRC і такий хімічний склад: Fe — 76,5%, Cr — 19%, Mo — 1,3%, Mn — 1%, Si — 1%, C — 0,95%, V — 0,12%, P — 0,04%, S — 0,03%. Твердість агатових кульок становила 6,5–7 Mohs; хімічний склад: SiO₂ — 99,91%, Al₂O₃ — 0,02%; Na₂O — 0,02%, Fe₂O₃ — 0,01%, K₂O — 0,01%, MnO — 0,01%, MgO — 0,01%, CaO — 0,01%.

Протипухлинний препарат доксорубіцин-КМП («Артеріум, Київмедпрепарат», Україна) піддавали ММХА з інтенсивністю підводу механічної енергії 20 Вт/г за допомогою просторового коливання камери з кульками й одночасному електромагнітному опроміненню синусоїдальної форми з частотою 42 МГц і вихідною потужністю генератора 6 Вт та постійним магнітним полем 12 мТл протягом 5 хв або імпульсним електромагнітним полем з частотою 600 кГц та вихідною потужністю генератора 2 Вт і постійним магнітним полем 12 мТл також упродовж 5 хв.

Магнітні характеристики препарату досліджували методом магнітометрії на вібра-

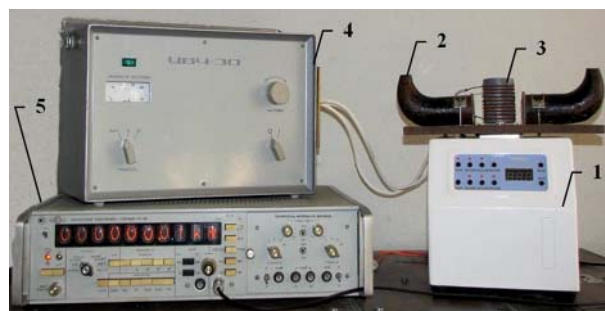


Рис. 1. Механомагнітний реактор: 1 — механохімічний реактор (мікробромлін); 2 — постійні магніти; 3 — індуктор; 4 — ВЧ-генератор; 5 — частотомер



Рис. 2. Робочі камери і тіла:

а — сталеву камеру вставлено в оболонку з поліметилметакрилату; б — фторопластова камера; в — капролактанова камера; г — камери у розібраному вигляді; д — сталеві робочі тіла; е — агатові робочі тіла

ційному магнітометрі Vibrating Magnetometer 7404 VSM (Lake Shore Cryotronics, Inc., США) у магнітних полях з напруженістю до 13 кЕ. Чутливість магнітометра становила 10^{-7} емо, що давало змогу виконувати виміри магнітного моменту на зразках масою до одиниць міліграмів. Масу досліджуваних зразків визначали за допомогою електронних мікроваг AB135-S/FACT з автокомпенсацією (METTLER TOLEDO, Швейцарія) чутливістю 10^{-5} г.

З метою дослідження стабільних вільних радикалів вивчали спектри та інтенсивність сигналу електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) [7], які реєстрували на модернізованому спектрометрі марки PE1307 (ЗЕПС АН) за температури рідкого азоту (77 К) у циліндричному резонаторі з модою H011, на частоті $9,15 \pm 0,01$ ГГц. Потужність надвисокочастотного випромінювання становила 40 мВт. Використовували модуляцію магнітного поля частотою 100 кГц. Пробу розміщували у кварцовому дюарі з внутрішнім діаметром 4,5 мм. Об'єм проби — 500 мл.

Для перевірки можливої зміни фізико-хімічних властивостей ДР після ММХА проводили хроматографічні дослідження. Для доксорубіцину гідрохлориду їх здійснювали згідно з методикою [8]. Використовували хроматографічну колонку Kromasil 100 C-18 розміром 250x4 мм з розміром пор 5 мкм. Рухома фаза складалася з ацетонітрилу та буферного розчину, приготованого з 2,88 г/л натрію лаурилсульфату та 2,25 г/л фосфорної кислоти, 1:1. Зразки (5 мкл) досліджува-

ли на рідинному хроматографі Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) за потоку рухомої фази 1 мл/хв та довжини хвилі 254 нм.

Для дослідження брали 1 мг ДР і розчиняли його у 2 мл дистильованої води, тобто концентрація речовини становила 0,5 мг/мл. Досліджувані методом хроматографії зразки було розділено на 4 групи: 1 — офіційний ДР; 2 — ДР після ММХА у капролактановій камері; 3 — ДР після ММХА у фторопластовій камері; 4 — ДР після ММХА у камері з органічних матеріалів із металевими вставками.

Результати та обговорення

Хроматографічні дослідження показали, що всі досліджувані зразки містять одну й ту саму речовину, оскільки час утримування основного піка збігався з контрольним зразком. Типові хроматограми розчинів, підготованих за різних умов, подано на рис. 3.

Результати вмісту ДР у досліджуваних зразках наведено в табл. 1.

Різниця в концентрації розчинів була зумовлена передусім технічними особливостями під час приготування зразків різними методами.

На хроматограмах розчинів після ММХА в капролактановій (Б) та фторопластовій (В) камерах спостерігалось утворення домішки з відносним часом утримання 0,9, відносна концентрація якої становила менше 1%.

У табл. 2 наведено зміни магнітних характеристик ДР під впливом ММХА з різними факторами механічного та електромагнітно-

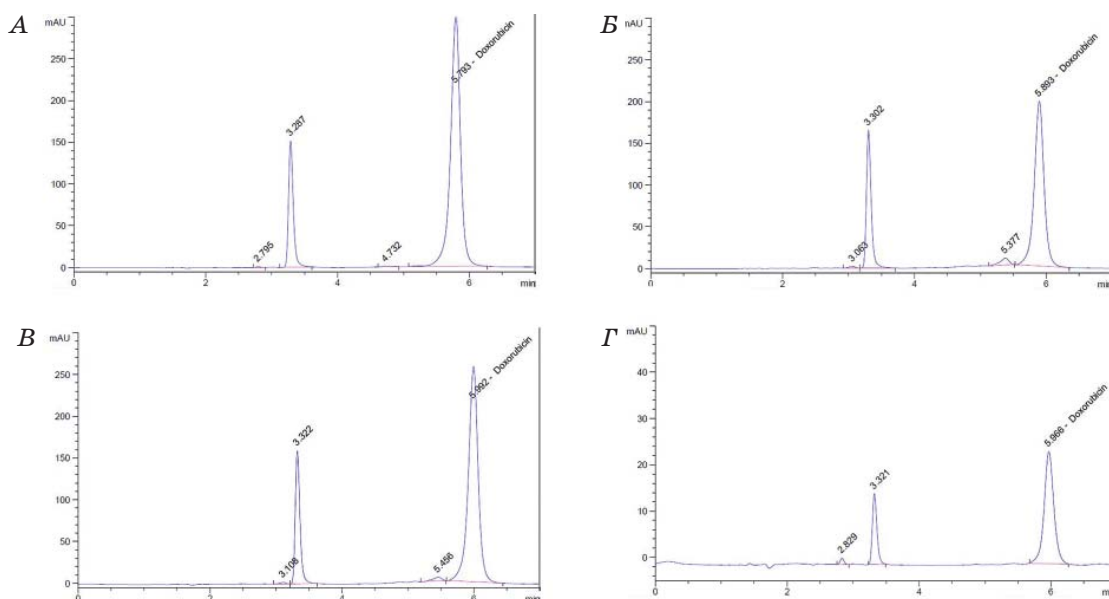


Рис. 3. Хроматограми розчинів: офіційний ДР (А) та після ММХА в капролактановій (Б), фторопластовій (В) і розбірній камері з органічних матеріалів із металевими вставками (Г)

Таблиця 1. Вміст ДР у мг/мл після ММХА за результатами хроматографії

№ зразка	Матеріал робочої камери	Площа основного піка, мАУ	Вміст основної речовини (ДР), мг/мл
1. ОФ ДР — контроль	—	3415,5±83	0,5±0,01
2. ММХА ДР	Капролакт	3227,6±71	0,47±0,01
3. ММХА ДР	Фторопласт	1437,4±24*	0,21±0,005*
4. ММХА ДР	Камера із органічних матеріалів з металевими вставками	1941,4±31*	0,28±0,006*

Тут і далі: * — статистично значущі відмінності порівняно з офіційним ДР із рівнем значущості $P < 0,05$.

Таблиця 2. Зміни магнітних характеристик ДР під впливом ММХА

Матеріал камери		робочих тіл	Форма сигналу електромагнітного поля	Питомий магнітний момент*, емо/г
Контроль офіційний ДР (без ММХА) діаманетик				
Капролактан, парамагнетик		Сталь	Синусоїдний	+0,024
Сталь, парамагнетик		Сталь	Синусоїдний	+0,071
Фторопласт, парамагнетик		Сталь	Синусоїдний	+0,053
Капролактан, парамагнетик		Сталь	Імпульсний	+0,019

*H = 3000 ерстед (напруженість магнітного поля).

го впливу. Аналіз цих результатів свідчить, що ДР у нативному стані є діаманетиком. Після ММХА він набуває властивостей парамагнетика, магнітні властивості якого залежать від факторів механічного та електромагнітного впливу. Так, мінімальний питомий магнітний момент (+0,024 емо/г) був після активації ДР у камері з капролактану, а максимальний (+0,071 емо/г) — після використання сталевих кульок у сталевій камері. Зміна форми сигналу електромагнітного поля із синусоїдальної до імпульсної форми призводила до зниження питомого магнітного моменту ММХА ДР у капролактановій камері до +0,019 емо/г.

Проведені раніше пілотні дослідження магнітних характеристик ДР під впливом ММХА показали, що застосування як робочих тіл агатових кульок у камері з капролактану зумовлювало зниження питомого магнітного моменту досліджуваних зразків на 50% порівняно з ММХА у цій камері з використанням сталевих кульок (питомі магнітні моменти зразків становили +0,034 емо/г з агатовими та +0,068 емо/г зі сталевими кульками). Оскільки зміни магнітного моменту мають однакові тенденції зі змінами концентрації парамагнітних центрів (вільних радикалів) у досліджуваних зразках [5], зниження питомого магнітного моменту за ММХА з агатовими кульками, у свою чергу, супроводжувалося зменшенням кількості парамагнітних центрів (вільних радикалів). Як наслідок, це призводить до зміни цитостатичної активності препарату. Виходячи

із цього, у наступних дослідах не проводили повторне вимірювання магнітних характеристик зразків після ММХА з використанням агатових кульок. Питомий магнітний момент насичення був більший у разі використання сигналу електромагнітного поля синусоїдальної форми порівняно з імпульсною.

Для детальнішого вивчення набутих парамагнітних властивостей ММХА ДР було досліджено його ЕПР-спектри (рис. 4 і 5). Аналіз наведених даних свідчить, що ЕПР-спектри ДР були подібні, незалежно від використаних матеріалів кульок для ММХА. Вони мали типові для офіційного ДР g-фактори 2,005, 2,003 та 1,97. Оскільки інтенсивність сигналу ЕПР ДР з g-фактором 2,003 була найбільшою порівняно із ДР з g-факторами 1,97 та 2,005 [4], наступні дослідження проводили саме із цим g-фактором. Інтенсивність сигналу ЕПР, яка залежить від кількості парамагнітних центрів після ММХА з використанням сталевих кульок, була на 22% вища, а з агатовими кульками — на 65% нижча, ніж в офіційного ДР.

В основі зміни магнітних властивостей ДР, на нашу думку, лежать багатофакторні фізико-хімічні процеси. По-перше, це фазові переходи, що зумовлені впливом електричних і магнітних полів та механічних напружень [9]. По-друге — виникнення вихрових струмів між тілами, що контактують [10], з ефектом утворення вільних радикалів та іонів [11]. І, нарешті, третє — можливе перенесення молекулярних фрагментів сполук, що контактують між собою [12].

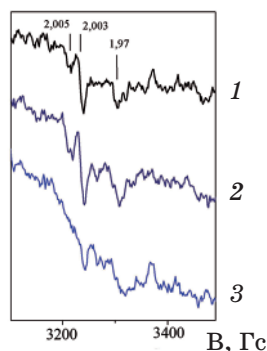


Рис. 4. Спектри ЕПР ДР: офіційний ДР (1), ММХА з використанням сталевих (2) та агатових (3) кульок

У проведених експериментальних доклінічних дослідженнях показано, що ММХА ДР мав вищий протипухлинний ефект, ніж офіційний [10]. Це свідчить про можливу перспективу застосування технології ММХА ДР з наномагнітними структурами у терапії злоякісних пухлин за зовнішнього впливу локального електромагнітного поля [13].

Таким чином, у конструкції механомагнітного реактора доцільно використовувати лінійний двигун, генератор електромагнітного поля із синусоїдальною формою сигналу, а також капролактанові, фторопласто-

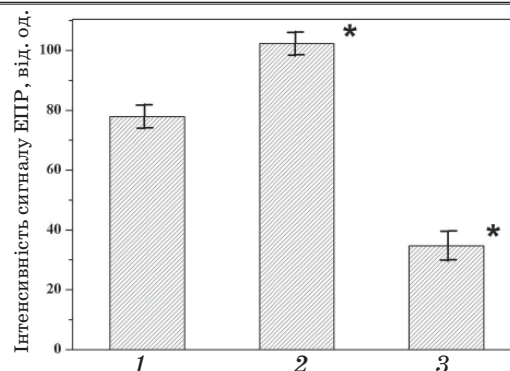


Рис. 5. Інтенсивність сигналу ЕПР (g-фактор 2,003): офіційний ДР (1), ММХА з використанням сталевих (2) та агатових (3) кульок

ві або з органічних матеріалів з металевими вставками робочі камери зі сталевими або агатовими робочими тілами залежно від необхідних магнітних властивостей протипухлинного препарату (наприклад, ДР).

Під впливом ММХА офіційний ДР, який є діамагнетиком, набуває властивостей парамагнетика, не змінюючи розподілу g-фактора в спектрах ЕПР та фармакопейних властивостей за результатами високо-ефективної рідинної хроматографії, що свідчить про перспективу його використання для нанотерапії злоякісних новоутворень.

REFERENCES

1. Peng X. H., Qian X., Mao H., Wang A. Y., Chen Z. G., Nie S., Shin D. M. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Int. J. Nanomed.* 2008, 3(3), 311–321.
2. Chekhun V. F., Todor I. N., Lukyanova N. Y., Shpyleva S. I., Naleskina L. A., Khaetsky I. K., Kulik G. I. The use of nanoferrromagnetics to increase the cytotoxic effect of antitumor drugs. *Exp. Oncol.* 2009, 31(3), 163–166.
3. Nicolais L., Carotenuto G. Metal-Polymer Nanocomposites. *New York: Wiley Interscience.* 2005, 300 p.
4. Orel V. E., Kudryavets Yu. I., Bezdenezhnik N. N., Satz S., Danko M. I., Khranovskaya N. N., Romanov A. V., Dzyatkovskaya N. N., Burlaka A. P. Mechanochemically activated doxorubicin nanoparticles in combination with 40 MHz frequency irradiation on A-549 lung carcinoma cells. *Drug Deliv.* 2005, N 12, P. 171–178.
5. Orel V. E., Shevchenko A. D., Mel'nik Yu. G., Nikolov N. A., Dzyatkovska I. I., Romanov A. V., Burlaka A. P., Lukin S. M., Uvarov V. N., Schepotin I. B. Physicochemical Characteristics of Magnetosensitive Nanocomplex Obtained by Mechanochemically Synthesized Technology of Dry Synthesis. *Metallofiz. Noveishie. Tekhnol.* 2010, 32(9), 1157–1167. (In Ukrainian).
6. Patent № 80456, UA, A61J 3/02. Magneto-mechano-chemical nanoreactor. Orel V. E., Rykhalskiy A. Y. Applied 27.12.2012; Published: 27.05.2013, Journal N 10. (In Ukrainian).
7. Gilbert B. C., Davies M. J. Electron Paramagnetic Resonance. — Cambridge: Royal society of Chemistry. 2006, 414 p.
8. European Pharmacopoeia 7.0. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. *Doxorubicin Hydrochloride.* 2011, 1897–1898.
9. Glinchuk M. D., Ragulya A. V. Nanoferrroics. *Kyiv.: Naukova dumka.* 2010, 311p. (In Russian).
10. Omote Y. An experimental attempt to potentiate therapeutic effects of combined use of pulsing magnetic fields and antitumor agents. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 1988, 89(8), 1155–1166.
11. Orel V. E., Movchan B. O., Dzyatkovska I. I., Nikolov M. O., Romanov A. V., Mel'nik Yu. G., Dzyatkovska N. M., Burlaka A. P., Lukin S. M. Research of influencing mechano- and magnetochemically synthesized magnetosensitive complex on the basis of nanoparticles of Fe₃O₄, doxorubicin and electromagnetic irradiation on animals with Guerin carcinoma. *Dopovidi Natsionalnoi Akademii Nauk Ukraini.* 2010, N 8, P. 207–212. (In Ukrainian).
12. Makarova T. L. Magnetic properties of carbon structures. *Semiconductors.* 2004, 38(6), 615–638.
13. Cohen A. E. Nanomagnetic Control of Intersystem Crossing. *J. Phys. Chem.* 2009, V. 113, P. 11084–11092.

МЕХАНОМАГНИТНЫЙ РЕАКТОР ДЛЯ АКТИВАЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

В. Э. Орел^{1,2}, *А. Ю. Рыхальский*^{1,2},
*А. Д. Шевченко*³, *Ю. А. Кондратова*⁴,
*А. П. Бурлака*⁵, *С. Н. Лукин*⁵, *И. Б. Щепотин*¹

¹Национальный институт рака
МЗ Украины, Киев

²Национальный технический университет
Украины «Киевский политехнический институт»

³Институт металлофизики им. Г. В. Курдюмова
НАН Украины, Киев

⁴ПАО «Фармак», Киев

⁵Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кравецкого
НАН Украины, Киев

E-mail: v-orel@voliacable.com

Использование механомагнитохимической активации позволяет повысить концентрацию парамагнитных центров (свободных радикалов) в противоопухолевом препарате, например доxorубине, что дает возможность непосредственно влиять на его магнитные свойства под действием внешнего электромагнитного поля и, как следствие, улучшить магнитную чувствительность и противоопухолевую активность. В работе изложены принципы конструкции и работы механомагнитного реактора для реализации этой технологии, заключающейся в комбинации влияния механомагнитной активации и электромагнитного облучения. При исследовании влияния механомагнитохимической активации на доxorубин были использованы методы вибрационной магнитометрии, спектроскопии электронного парамагнитного резонанса и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты проведенных исследований показали, что в конструкции механомагнитного реактора целесообразно использовать генератор электромагнитного поля с синусоидальной формой сигнала, рабочие камеры из капролактана, фторопласта или из органических материалов с металлическими вставками, а также рабочие тела из стали или агата в зависимости от требуемых магнитных свойств доxorубина. Под влиянием механомагнитохимической активации доxorубин, являющийся диамагнетиком, приобретает свойства парамагнетика, не изменяя распределения g -факторов в спектрах электронного парамагнитного резонанса. Полученные результаты свидетельствуют о перспективе использования технологии механомагнитохимической активации доxorубина для терапии онкологических заболеваний, в частности ее целенаправленного применения в случае наноразмерных магнитных структур и внешнего электромагнитного облучения.

Ключевые слова: свободные радикалы, доxorубин, механомагнитохимическая активация.

MECHANOMAGNETIC REACTOR FOR ACTIVATION OF ANTICANCER DRUGS

V. E. Orel^{1,2}, *A. Y. Rykhalskiy*^{1,2},
*A. D. Shevchenko*³, *Yu. A. Kondratova*⁴,
*A. P. Burlaka*⁵, *S. N. Lukin*⁵, *I. B. Schepotin*¹

¹National Cancer Institute, Ministry of Medical
Health, Kyiv, Ukraine

²National Technical University of Ukraine
«Kyiv Polytechnic Institute», Kyiv

³Kurdyumov Institute for Metal Physics of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

⁴PAC «Farmac», Department of Research
and Development, Kyiv, Ukraine

⁵Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: v-orel@voliacable.com

Mechanomagnetochemical activation can increase the concentration of paramagnetic centers (free radicals) in the anticancer drug, for example, doxorubicin that enables to influence its magnetic properties under external electromagnetic field and improve its magnetic sensitivity and antitumor activity. The principles of design and operation of mechanomagnetic reactor for implementation of this technology which includes mechanomagnetochemical activation and electromagnetic radiation of the drug are described in the paper. The methods of vibration magnetometry, electron paramagnetic resonance spectroscopy and high-performance liquid chromatography were used for studying of doxorubicin mechanomagnetic activation effects.

The studies have shown that a generator of sinusoidal electromagnetic wave, working chambers from caprolactam, fluoroplastic or organic materials with metal inserts and working bodies made from steel or agate depending on the required doxorubicin magnetic properties are expedient to use in the designed mechanomagnetic reactor. Under influence of mechanomagnetochemical activation doxorubicin, which is diamagnetic, acquires the properties of paramagnetic without changing g -factors in the spectra of electron paramagnetic resonance. Mechanomagnetochemical activation of doxorubicin satisfies pharmacopoeia conditions according to the results of liquid chromatography that points on perspective of this method using in technology of tumor therapy with nanosized structures and external electromagnetic radiation.

Key words: free radicals, doxorubicin, mechanomagnetochemical activation.