

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-65-77>

Наночастицы оксида железа как потенциальные агенты для комбинированной лучевой терапии

М.В. Шестовская, А.Л. Лусс, В.В. Макаров, В.С. Юдин, А.А. Кескинов

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства; Россия, 119121 Москва, Шукшинская ул., 5

Контакты: Мария Владимировна Шестовская MShestovskaya@cspfmba.ru

Введение. Наночастицы (НЧ) оксида железа представляют собой перспективную тераностическую платформу для комбинированной лучевой терапии: реакционная способность оксида железа усиливает окислительный стресс опухолевых клеток, ассоциированный с облучением, а магнитные свойства могут обеспечить дополнительное преимущество в виде контролируемой доставки.

Цель исследования – изучение потенциала гепаринизированных НЧ оксида железа в экспериментальной противоопухолевой терапии.

Материалы и методы. Синтез НЧ оксида железа осуществляли химическим осаждением с магнитной сепарацией, полученный золь стабилизировали гепарином. Для каждой партии вновь синтезированных частиц проводили ИК-спектроскопию, рентгеноструктурный анализ, сканирующую электронную микроскопию и определяли гидродинамический диаметр. Выбранную для исследования опухолевую модель рабдомиосаркомы МХ-7 перевивали самкам мышей линии СЗНА, введение НЧ осуществляли внутрь опухоли или внутривенно, 1 раз в день, по схеме «5–2–5». Фракционное облучение (1–2 Гр/фракция; $1,3 \pm 0,15$ Гр/мин) проводили после введения НЧ. Для мышей экспериментальных групп определяли увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %), степень торможения роста опухоли (ТРО, %), проводили патоморфологическую оценку образцов легкого, печени, селезенки и опухолевого узла.

Результаты. В результате исследования установлено, что при внутриопухолевом введении гепаринизированные НЧ оксида железа задерживаются внутри опухоли, оказывая умеренный аддитивный эффект по сравнению с изолированной радиотерапией на 1-й неделе облучения: ТРО = 40 % (6-е сутки), суммарная очаговая доза (СОД) = 10 Гр; $p < 0,05$, однако при увеличении объема опухоли к концу 2-й недели схема лечения не превосходила радиотерапию по эффективности. При комбинации радиотерапии и внутривенного введения НЧ эффект наблюдали в течение 2 нед: ТРО = 43 % (6-е сутки), ТРО = 29 % (14-е сутки), СОД = 10 Гр; $p < 0,05$; УПЖ = 54 %, СОД = 20 Гр; $p < 0,05$.

Заключение. Изучаемый нанопрепарат оксида железа повышал способность лучевой терапии ингибировать рост рабдомиосаркомы при внутривенном введении и последовательном облучении экспериментальных мышей.

Ключевые слова: наночастицы оксида железа, рабдомиосаркома, ионизирующее облучение, комбинированная терапия, противоопухолевая активность

Для цитирования: Шестовская М.В., Лусс А.Л., Макаров В.В. и др. Наночастицы оксида железа как потенциальные агенты для комбинированной лучевой терапии. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3): 65–77.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-65-77>

Iron oxide nanoparticles as potential agents for combined radiotherapy

Maria V. Shestovskaya, Anna L. Luss, Valentin V. Makarov, Vladimir S. Yudin, Anton A. Keskinov

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency; 5/1 Shchukinskaya St., Moscow 119121, Russia

Contacts: Maria Vladimirovna Shestovskaya MShestovskaya@cspfmba.ru

Background. Iron oxide nanoparticles (NP) represent a promising theranostic platform for combined radiotherapy: the reactivity of iron oxide enhances oxidative stress of tumor cells associated with irradiation while magnetic properties may provide additional feature as controlled delivery.

Aim. To study the potency of heparinized iron oxide NP in experimental antitumor therapy.

Materials and methods. The synthesis of iron oxide NP was carried out by chemical precipitation followed by magnetic separation, the resulting sol was stabilized with heparin. For each batch of newly synthesized particles, the hydrodynamic diameter was determined, IR spectrometry, X-ray diffraction analysis, and scanning electron microscopy were performed. The MX-7 tumor model of rhabdomyosarcoma chosen for the study was transplanted into female C3HA mice; NP were administered intratumorally or intravenously, once a day, according to the “5–2–5” scheme. Fractional irradiation (1–2 Gy/fraction; 1.3 ± 0.15 Gy/min) was carried out after NP administration. Increasing life expectancy (ILE), the degree of tumor growth inhibition (TGI), a pathomorphological assessment of the lung, liver, spleen and tumor node was carried out for all experimental mice.

Results. As a result of the study, it was found that when administered intratumorally, heparinized iron oxide NP are retained inside the tumor, providing a moderate additive effect, compared with isolated radiotherapy in the first week of irradiation (TGI = 40 % (day 6), TFD = 10 Gy, $p < 0.05$), however, with an increase in tumor volume by the end of the second week, the treatment regimen was not more effective than radiotherapy. With a combination of radiotherapy and intravenous administration of NP, the effect was observed within two weeks (TGI = 43 % (day 6), TGI = 29 % (day 14), TFD = 10 Gy; $p < 0.05$; ILE = 54 %, TFD = 20Gy; $p < 0.05$).

Conclusion. The studied iron oxide nanopreparation enhanced capacity of radiation therapy to inhibit tumor growth when administered intravenously in experimental mice with rhabdomyosarcoma and irradiated subsequently.

Keywords: iron oxide nanoparticles, rhabdomyosarcoma, ionizing radiation, combined therapy, antitumor activity

For citation: Shestovskaya M.V., Luss A.L., Makarov V.V. et al. Iron oxide nanoparticles as potential agents for combined radiotherapy. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2024;23(3):65–77.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-65-77>

Введение

Последние десятилетия развитие нанотехнологий находится в центре исследовательского внимания благодаря физико-химическим свойствам наночастиц (НЧ): высокой механической и термической стабильности, обширной площади поверхности, а также уникальным оптическим, электрическим и в ряде случаев — магнитным свойствам [1, 2]. Так, НЧ благородных металлов (серебра, золота, платины), а также полимерные и липосомальные НЧ применяют в качестве наноносителей для различных химиотерапевтических и диагностических агентов при злокачественных новообразованиях (ЗНО) [2–4]. Одной из предшествующих этому причин стал открытый в 1980-х годах эффект повышенной проницаемости и удержания (ППУ) [5]. Суть эффекта ППУ заключается в том, что чрезмерное разрастание сосудов солидной опухоли, вызванное ее повышенной потребностью в кислороде и питании, способствует микроразрывам стенок сосудов и делает их пористыми и проницаемыми для макромолекул, а из-за нарушенного оттока межклеточной жидкости, сопутствующего разрастанию опухоли, поглощенные макромолекулы задерживаются и накапливаются в структурах опухолевой ткани [5, 6].

Конъюгация наноносителей с терапевтическими молекулами и дополнительная функционализация различными лигандами *de novo* предоставляет НЧ неограниченные возможности применения в тераностике ЗНО. В качестве лиганда могут выступать органические и неорганические высокомолекулярные

соединения, белки, пептиды, моноклональные антитела и другие биоактивные молекулы, в зависимости от предполагаемой мишени [2, 4]. Особенный интерес представляют собой такие наноносители, как суперпарамагнитные НЧ оксида железа и гадолиния, которые используют в качестве контрастного средства для магнитно-резонансной томографии [4]. Суперпарамагнитные НЧ обладают сверхмалыми размерами и преимуществом контролируемой доставки с помощью магнитного поля. Нанопрепарат (НП) на основе оксида железа может рассматриваться как потенциальный агент для противоопухолевой терапии не только благодаря контролируемой доставке, но и реакционной способности оксида железа, которую можно использовать для усиления стресса ионизации опухолевых клеток при лучевой терапии (ЛТ): циклы Фентона и Габера–Вейса и эффект Варбурга [7, 8].

В рамках разработки тераностической платформы для комбинированной ЛТ была изучена стабильность и эффективность НЧ оксида железа II/III *in vivo* при комбинации с ЛТ. Для модификации поверхности частиц использовали гепарин — гликопротеин, который служит биосовместимым антикоагулянтом и сорбируется на поверхности частиц, образуя стабильный комплекс при нейтральном pH. Помимо этого, было показано, что гепарин обладает низкой токсичностью *in vivo* и снижает тромбоэмболические проявления у онкологических больных, что может быть дополнительным преимуществом в ряде случаев [9]. В качестве модельной линии для исследования была выбрана рабдомиосаркома — саркома мягких

тканей, на которую, по разным оценкам, приходится 3–7 % случаев ЗНО детского возраста [10, 11]. Данная опухоль может сформироваться практически из любого типа мышечной ткани любой локализации, в результате чего клинические проявления сильно варьируются. Большинство больных с локализованной рабдомиосаркомой излечимы, однако прогнозы для пациентов с метастазами остаются неблагоприятными. Опухоль обычно обнаруживают при компьютерной или магнитно-резонансной томографии, что особенно важно для разработки тераностического средства, локализацию которого будет возможно контролировать магнитным полем.

Целью настоящего исследования являлась оценка эффективности комбинированного лучевого лечения с гепаринизированными НЧ оксида железа в сравнении с изолированной радиотерапией мышечной рабдомиосаркомы.

Материалы и методы

Синтез наночастиц оксида железа

Сначала 2,5 г хлорида железа (II) 4-водного («Ленреактив», Россия) и 5 г хлорида железа (III) 6-водного («Реахим», Россия) смешивали в плоскодонной колбе в 100 мл очищенной деионизированной воды и перемешивали с помощью магнитного перемешивающего устройства со скоростью 500 об/мин в течение 10 мин до образования гомогенного раствора. Затем добавляли раствор аммиака (25 %, «Ленреактив», Россия) в объеме 10 мл и вновь перемешивали в течение 10 мин. Далее производили 6-кратную магнитную сепарацию на постоянном магните (0,5 Тл) в 50–100 мл деионизированной воды со сменой надосадочной жидкости. Промывку прекращали при pH 7,1–7,5. Полученные НЧ помещали в реактор, снабженный перемешивающим устройством (37 кГц) и ультразвуковым излучателем (110 Вт), и выдерживали в течение 120 мин при термостатировании (25 °С) и постоянном перемешивании (500 об/мин). Определяли массовую долю НЧ путем высушивания 1 мл суспензии образца до постоянной массы. Среднее содержание НЧ в золе после отмывки составляло 2,5 %. Суспензию разводили деионизированной водой и раствором гепарина натрия (5000 Ед/мл, «Белмедпрепараты», Беларусь) так, чтобы массовая доля НЧ составляла 1,4 %, и перемешивали 500 об/мин в течение 15 мин. Несвязанный гепарин очищали диализом против воды (диализные мешки Spectra/Por, Spectrum Laboratories, Inc., США, с отсечкой по молекулярной массе 12–14 кДа) в течение 24 ч с 5-кратной сменой воды. Содержание гепарина в препарате определяли по содержанию гексозаминов [12], в качестве стандарта использовали чистый гепарин. Содержание гепарина по отношению к введенному в реакционную смесь составило 73 %.

Определение физико-химических характеристик наночастиц оксида железа

Гидродинамический диаметр НЧ определяли методом динамического светорассеяния на приборе Nanotrac Flex II (Microtrac, США) [13]. Инфракрасные спектры исследовали на спектрометре Nicolet 380 (Thermo Scientific, США) с использованием таблеток KBr. Лиофилизаты НП анализировали методом рентгеновской порошковой дифракции на приборе Rigaku SmartLab (Япония) [14] в соответствии с инструкцией к прибору (скорость сканирования 1–2°/мин в диапазоне 2θ 20–80°). Микрофотографии НЧ оксида железа снимали на сканирующем электронном микроскопе Tescan VEGA 3 SBH (США).

Моделирование рабдомиосаркомы мышей

Клетки линии рабдомиосаркомы мышей MX-7 культивировали в ростовой среде (90 % DMEM [dulbecco's modified eagle's medium], 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина) 4 пассажа. Затем клетки переосаждали в бессывороточной среде DMEM, не содержащей антибиотика, и перевивали мышам линии СЗНА (питомник РАМН «Рапполово»). Перевивку опухоли осуществляли путем введения 10^7 опухолевых клеток в 75 мкл полученной суспензии в подвздошную область. В течение всего эксперимента 1 раз в 2 дня животных взвешивали, пальпировали опухоль и проводили замеры с помощью электронного штангенциркуля производства Adolf Wirth GmbH (Германия). Условием для начала эксперимента являлось наличие опухоли диаметром более 4 мм.

Проведение комбинированной лучевой терапии

В рамках исследования противоопухолевой активности НП мышам с рабдомиосаркомой проводили курс ЛТ в сочетании с внутривенным или внутриопухолевым введением НЧ. Исходя из серии предварительных экспериментов, доклинических рекомендаций [15], а также экспериментов, проведенных коллегами [16], доза препарата для внутриопухолевого введения составила 2 мл/кг/день (2,8 мг/кг/день по $\text{FeO} \times \text{Fe}_2\text{O}_3$) и для внутривенного – 10 мл/кг/день (14 мг/кг/день по $\text{FeO} \times \text{Fe}_2\text{O}_3$). Выбор первоначальной дозы обусловлен данными литературы об эффективности фракционной терапии перевитой рабдомиосаркомы в дозе 2 Гр в течение 4–8 нед (общая доза 40–80 Гр) [17]. Облучение проводили на базе НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ на γ -установке для радиационных исследований РХ- γ -30 (ВО «Изотоп») по схеме «5–2–5» (5 дней облучения – перерыв 2 дня – 5 дней облучения) в строго установленное время при режиме $1,3 \pm 0,15$ Гр/мин,

величину фракционной дозы регулировали временем воздействия. В процессе пилотного эксперимента были сформированы экспериментальные группы ($n = 6$), подвергавшиеся облучению 2 Гр за фракцию: 1 – мыши без лечения, 2 – мыши, получающие только радиотерапию, 3 – мыши, получающие радиотерапию и внутриопухолевое введение НЧ (2 мл/кг), 4 – мыши, получающие радиотерапию и внутривенное введение НЧ (10 мл/кг). Животные продемонстрировали повышенную в сравнении с ожидаемой радиочувствительность, для них был вычислен показатель увеличения продолжительности жизни (УПЖ), при этом показатель торможения роста опухоли (ТРО) не имел статистической достоверности из-за высокой смертности. В процессе основного эксперимента фракционная доза была понижена до 1 Гр для достоверной оценки динамики роста опухоли и ТРО.

Показатели противоопухолевой активности

В рамках данной работы оценивали динамику изменения размеров опухоли и продолжительности жизни в экспериментальных группах [18].

Так, показатель ТРО рассчитывали по формуле (1):

$$\text{ТРО} = (V_k - V_o) / V_k \times 100 \%, \quad (1)$$

где V_o – средний объем опухоли у животных в опытной группе, V_k – средний объем опухоли у животных в контрольной группе.

Объем опухоли определяли согласно формуле (2):

$$V = 0.5L \times W^2, \quad (2)$$

где V – объем опухоли в мм^3 , L – длина опухоли, W – ширина опухоли.

Показатель УПЖ вычисляли по формуле (3):

$$\text{УПЖ} = ((\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k) / \text{СПЖ}_k) \times 100 \%, \quad (3)$$

где СПЖ – средняя продолжительность жизни, выраженная в днях, в группах: опытной и контроля соответственно.

Патоморфологическое исследование

Патоморфологическое исследование проводили посмертно для всех погибших и планово выведенных из эксперимента животных. При осмотре трупов животных оценивали состояние прилегающих тканей, состояние самой опухоли (некрозы, капсула, наличие выпота), ее способность отделяться от прилегающих тканей, регистрировали наличие метастатических очагов роста, их локализацию и размеры. После первичного осмотра органов оценивали состояние опухолевого узла: проводили анатомирование области

роста опухоли и измеряли по трем взаимно перпендикулярным направлениям для вычисления конечного объема: длина (L), ширина (W) и толщина (T).

Гистологическое исследование

Печень, селезенку, легкие и опухолевую ткань фиксировали в 10 % нейтральном буферном формалине (HistoPoint, Россия) и подготавливали к гистологическому исследованию с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином (HistoPoint, Россия) по Майеру [19]. Срезы толщиной 5 мкм получали с помощью микротомы МПЗ-01 («Техном», Россия). Фотодокументирование проводили при помощи световой микроскопии.

Статистическая обработка

Обработку результатов проводили при помощи программного обеспечения Open Office, Prism 8 (GraphPAD, США), Statistica (TIBCO, США). После оценки нормальности распределения данных по выживаемости проводили статистический анализ значимости полученных результатов с помощью логрангового теста Мантеля–Хензеля и теста Гехана–Вилкоксона. Для анализа данных по изменению динамики роста опухоли между 2 группами использовали U-критерий Манна–Уитни, для оценки достоверности различий в нескольких группах применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) Краскелла–Уоллиса. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Физические свойства нанопрепарата

С помощью сканирующей электронной микроскопии детектировали сферические НЧ со средним диаметром 10–25 нм (рис. 1, а). При этом высококонцентрированные образцы в водной среде образовывали агрегаты до 100–130 нм вследствие гидратации поверхности (рис. 1, б), что является распространенным явлением [20], напоминая о необходимости предварительного подбора правильных концентраций препарата перед введением.

Результаты рентгеновской порошковой дифракции показали, что основным компонентом системы является магнетит ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \times \text{FeO}$) с его характерными пиками поглощения – 220 (30,35°), 311 (35,63°), 400 (43,49°), 422 (53,56°), 511 (57,12°) (рис. 1, в). На ИК-спектрах гепаринизированных НЧ оксида железа также виден характерный пик магнетита в области 588,9 см – 1, и полосы поглощения, соответствующие гепарину: 1045,0 см – 1 – асимметричное колебание S = O, 1236,0 см – 1 – симметричное колебание S = O в NH-SO_3 и $\text{CH}_2\text{-SO}_3$, а также полосы поглощения в области 1400,9 и 1630,8, соответствующие группам N-H и C = O [21] (рис. 1, г).

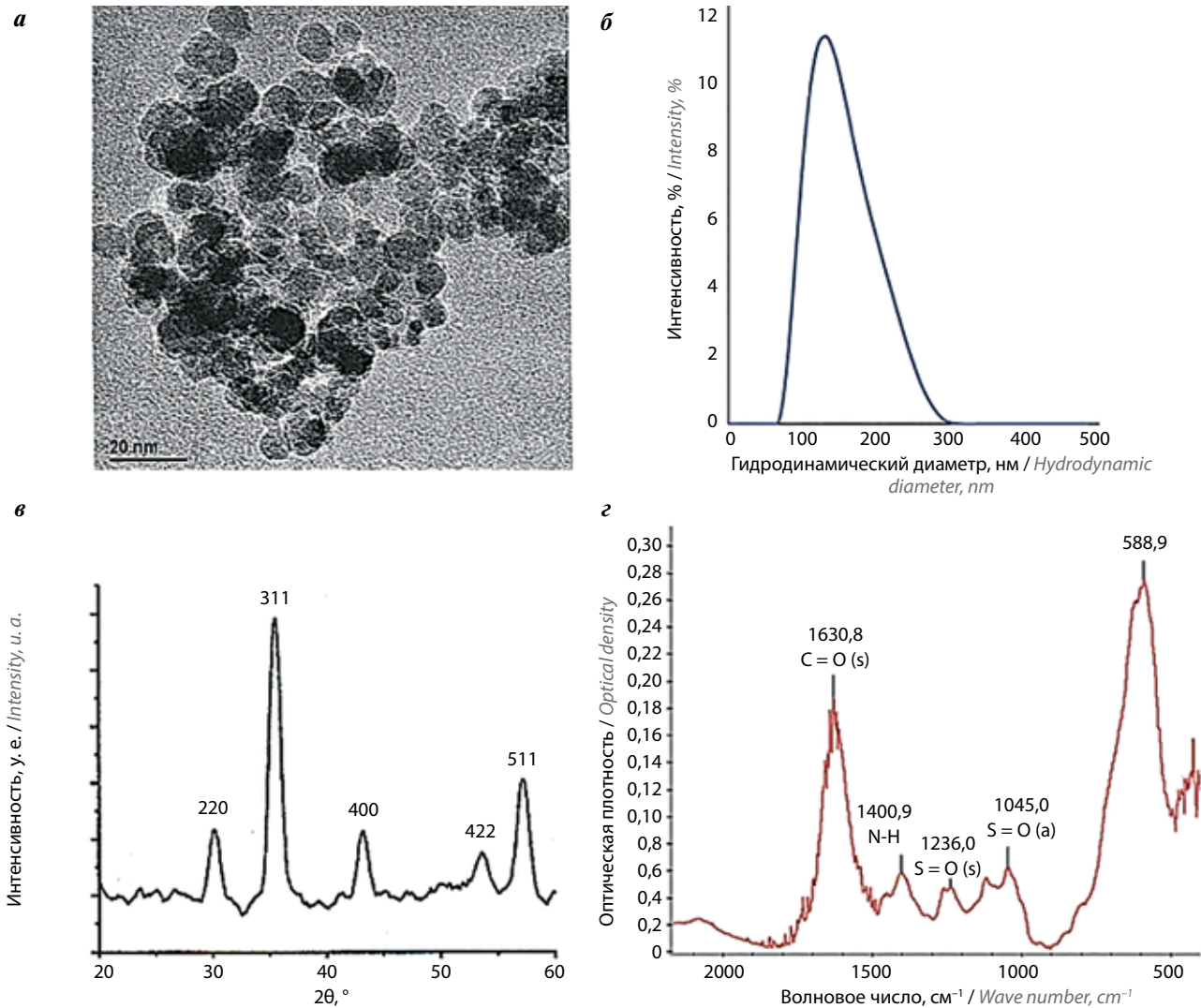


Рис. 1. Физические характеристики исследуемого нанопрепарата: а – сканирующая электронная микроскопия образца нанопрепарата; б – распределение наночастиц в образце по гидродинамическому диаметру (динамическое светорассеяние); в – качественный анализ (рентгеновская порошковая дифракция); г – структурно-элементный анализ (ИК-спектроскопия)

Fig. 1. Physical characteristics of studied nanopreparation: а – scanning electron microscopy of a nanopreparation sample; б – distribution of nanoparticles in a sample along the hydrodynamic diameter (dynamic light scattering); в – qualitative analysis (X-ray powder diffraction); г – structural element analysis (IR spectroscopy)

Противоопухолевая активность гепаринизированных наночастиц оксида железа в модели рабдомиосаркомы мышей

Для оценки противоопухолевой активности НЧ при комбинации с ЛТ рассчитаны показатели УПЖ мышей, подвергавшихся дозе облучения 2 Гр (рис. 2, а). Внутривенное введение НЧ мышам, получавшим облучение в дозе 2 Гр, способствовало увеличению средней продолжительности их жизни на 54 % ($p < 0,05$) по сравнению с группой животных, получавших изолированную радиотерапию. При этом при понижении фракционной дозы до 1 Гр выживаемость всех экспериментальных групп была сто-процентной (рис. 2, б).

Результаты, полученные для мышей, подвергавшихся дозе облучения 1 Гр ($n = 24$), составили основу репрезентативных данных для оценки изменения объемов опухоли под воздействием ионизирующего облучения внутри экспериментальных подгрупп (рис. 3).

Внутриопухолевое введение гепаринизированных НЧ оксида железа в комбинации с ЛТ в дозе 1 Гр краткосрочно ингибировало опухоль на первой неделе облучения (ТРО=40 %; $p < 0,05$), но по результатам 2-й недели не оказало стабильного влияния на уменьшение объема опухоли по сравнению с радиотерапией. Вероятно, эффект был ограничен их частичным агрегированием и неравномерным распределением внутри опухолевого узла. Внутривенное введение НП

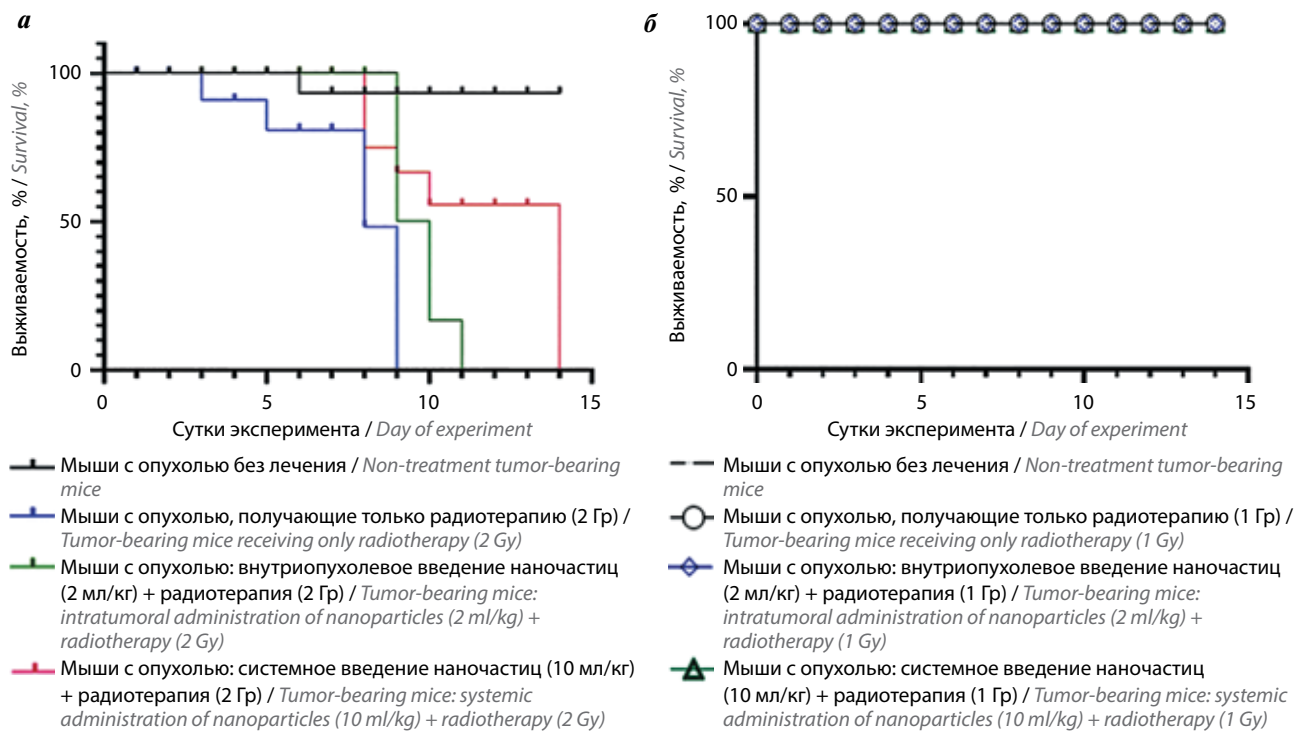


Рис. 2. График выживаемости экспериментальных мышей, получавших фракционную дозу 2 Гр (а) и 1 Гр (б) при внутривенном и внутритуморозном введении нанопрепарата

Fig. 2. Survival graph of experimental mice exposed 2 Gy (a) and 1 Gy (б) fractional dose and subjected intravenous or intratumoral administration of nanopreparation

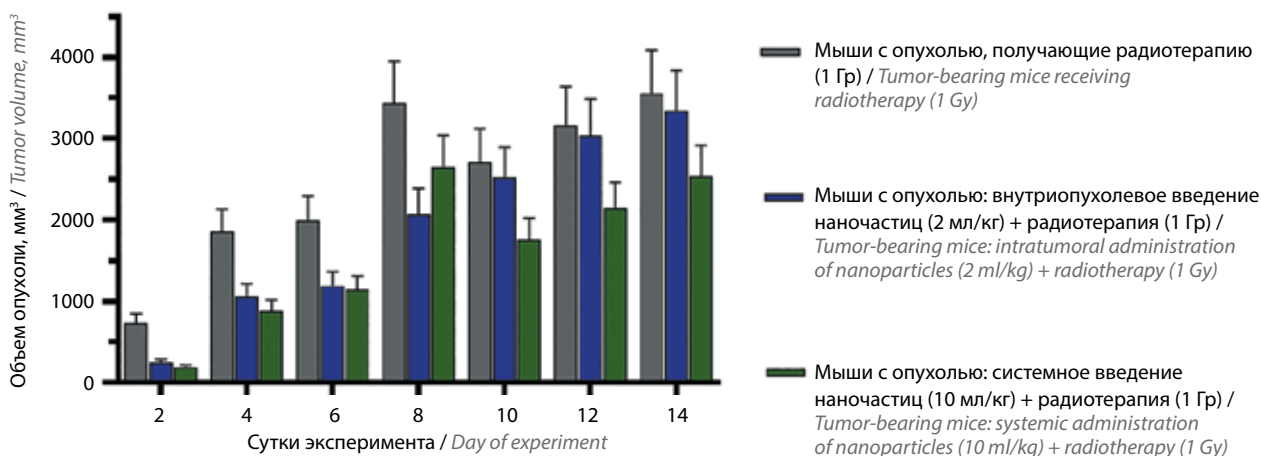


Рис. 3. Динамика изменения объема опухоли животных (нормализованные данные) при экспозиции с наночастицами (внутривенное или внутритуморозное введение) в группах, подвергавшихся облучению 1 Гр

Fig. 3. Dynamics of changes in tumor volume of animals (normalized data) during exposure to nanoparticles (intravenous or intratumoral administration) in groups exposed to 1 Gy irradiation

в сочетании с облучением в дозе 1 Гр продемонстрировало повышенную, по сравнению с изолированной радиотерапией, эффективность лечения на протяжении всего эксперимента, снижая объем опухоли в исследуемой модели мышей с перевиваемой рабдомиосаркомой по сравнению с группой мышей, получавших только облучение: ТРО = 40 % (6-е сутки), ТРО = 29 % (14-е сутки); $p < 0,05$.

Результаты патоморфологического исследования селезенки, легких и печени мышей с рабдомиосаркомой

Умерщвление животных (при выведении из эксперимента) осуществляли путем помещения в CO₂-камеру, гистологическая картина легких во всех группах была однотипной и характерной для удушья (рис. 4, а–г): чередование участков ателектазов

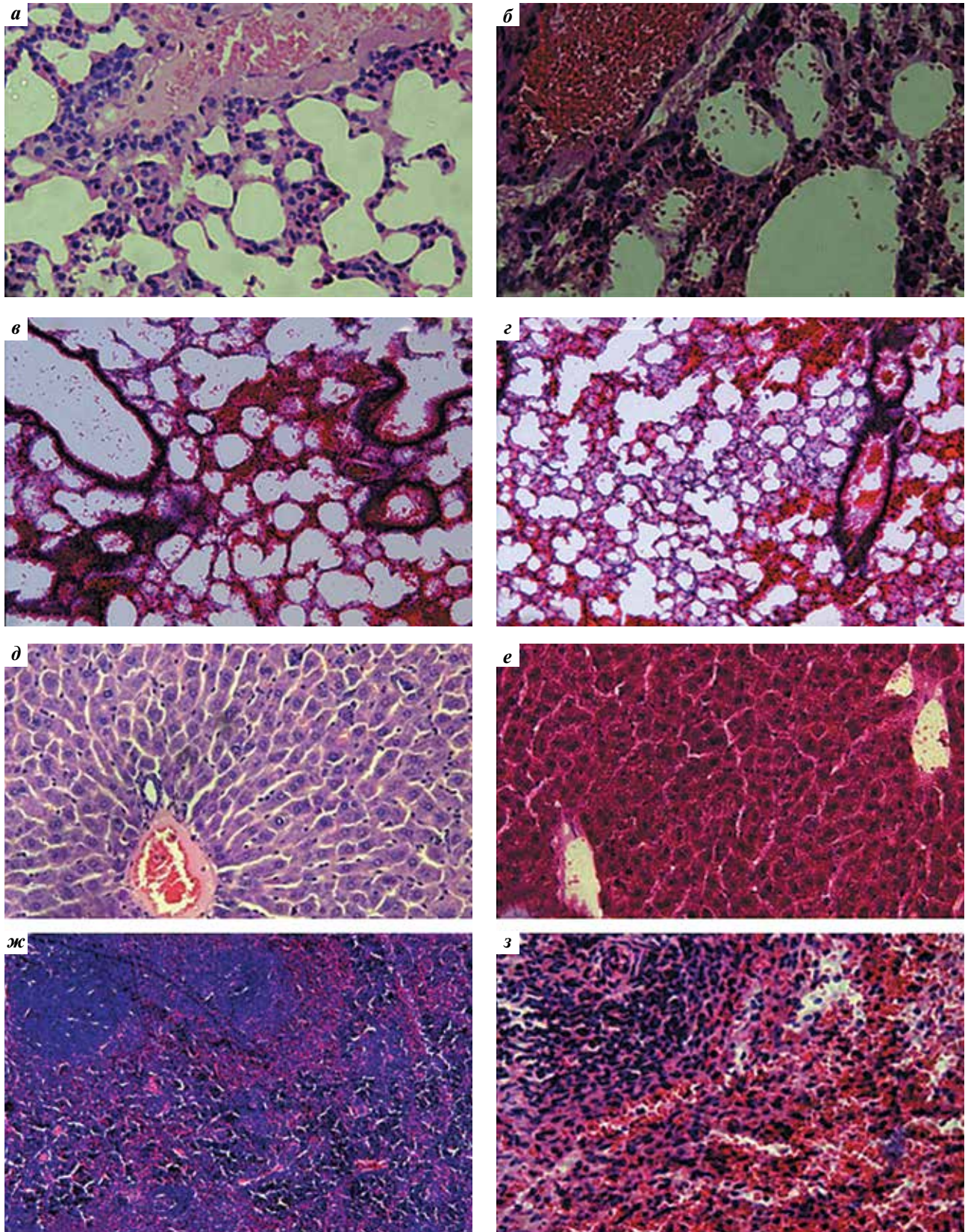


Рис. 4. Микрофотографии образцов легкого 1–4-й групп (а–г), печени 1-й, 2-й групп (д, е) и селезенки 1-й, 2-й групп (ж, з) экспериментальных животных

Fig. 4. Microphotographs of lung samples of groups 1–4 (a–g), liver of groups 1 and 2 (d, e) and spleen of groups 1 and 2 (ж, з) of experimental animals

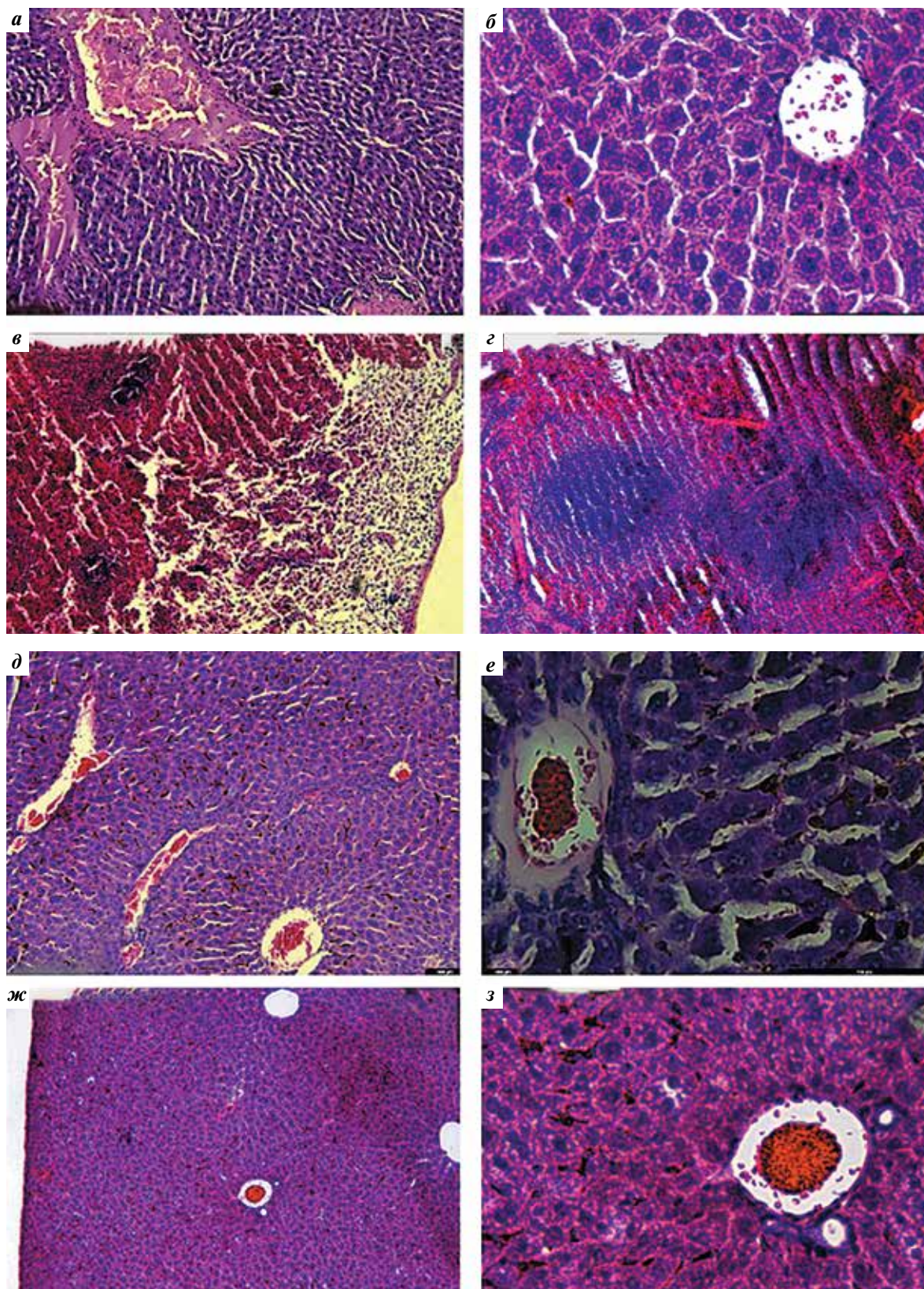


Рис. 5. Микрофотографии образцов печени (а, б) и селезенки (в, з) мышей 3-й группы. Микрофотографии образцов печени (д, е) и селезенки (ж, з) мышей 4-й группы. Увеличение: а, в, д, ж – $\times 10$; б, з, е, и – $\times 40$

Fig. 5. Microphotographs of the liver (а, б) and spleen (в, з) samples of mice from group 3. Microphotographs of the liver (д, е) and spleen (ж, з) samples of mice from group 4. Magnification: а, в, д, ж – $\times 10$; б, з, е, и – $\times 40$

и эмфизематозного расширения альвеол с разрывом межальвеолярных перегородок, интерстициальный отек легких с обширными участками микрокровотечений.

В микропрепаратах печени и селезенки 1-й группы (мыши без лечения, «б/л») существенных изменений не наблюдали (рис. 4, д, ж). В микропрепаратах печени животных 2-й группы, получавших только радиотерапию («РТ»), наблюдали гепатоциты с 2 ядрами или крупным ядром, при этом структура печеночных балок была сохранена, дольки имели гексагональную форму, гепатоциты – без признаков дистрофии (рис. 4, е). В селезенке визуализировали белую и красную пульпы без атипичных изменений (рис. 4, з). В образцах печени (рис. 5, а, б) 3-й группы (радиотерапия + внутриопухолевое введение НЧ, «РТ + в/о») были обнаружены единичные клетки звездчатой формы (предположительно купферовские), расположенные между гепатоцитами, рядом с центральной венной; цитоплазма клеток содержит бурые включения (предположительно НЧ железа), при этом структура селезенки (рис. 5, в, г) сохранена. В образцах печени (рис. 5, д, е) группы 4 (радиотерапия + внутривенное введение НЧ, «РТ + в/в») по ходу печеночных балок, между гепатоцитами и гемокapилляром, визуализируются многочисленные скопления бурых агломератов, предположительно НЧ железа в составе купферовских клеток. Цитоплазма клеток печени (см. рис. 5, д, е) и селезенки (рис. 5, ж, з) была плотно заполнена бурыми включениями, предположительно НЧ железа.

Результаты морфологической оценки опухолевых образцов мышечной ткани с рабдомиосаркомой

Для морфологической оценки изучены образцы опухолей с прилежащими тканями латеральной

поверхности тела мышечной. Морфологическая картина для опухолевых образцов была типичной: опухоль была представлена вытянутыми базофильными клетками овальной или полосовидной формы с размытыми краями (рис. 6, а). Ядра клеток обладали признаками полиморфизма: овальные, вытянутые, палочковидные, с 2–3 или 4–5 (до 8) ядрышками, встречались атипичные митозы. Опухолевая ткань отделялась от окружающих ее тканей организма капсулой, представленной фиброзной тканью (рис. 6, б), инфильтрированной опухолевыми клетками. В составе фиброзной капсулы наблюдались множественные расширенные сосуды гемомикроциркуляторного русла, с просветом, плотно заполненным эритроцитами в состоянии сладжа. Сосуды имели тонкую стенку, округлую или овальную формы и соответствовали венозному звену гемомикроциркуляторного русла.

Ниже приведены особенности, характеризующие каждую из исследуемых групп животных:

1-я – мыши без лечения, «б/л» (рис. 7, а): опухолевые клетки характеризовались крупным, округлым, часто просветленным ядром, с большим количеством ядрышек; опухоль отделялась от окружающих тканей толстой прослойкой фиброзной ткани (см. рис. 6, б); часто встречались сосуды гемомикроциркуляторного русла, все они были с признаками венозного застоя.

2-я – мыши, получавшие только радиотерапию («РТ») (рис. 7, б): клетки опухолевого очага имели меньший размер и более компактные ядра, вытянутой, преимущественно овальной формы, с повышенным содержанием гетерохроматина.

3-я – радиотерапия + внутриопухолевое введение НЧ, «РТ + в/о» (рис. 7, в): морфологическая картина соответствовала изменениям, выявленным во 2-й группе, однако внутри опухоли, преимущественно около капсулы, скапливались зерна бурого пигмента

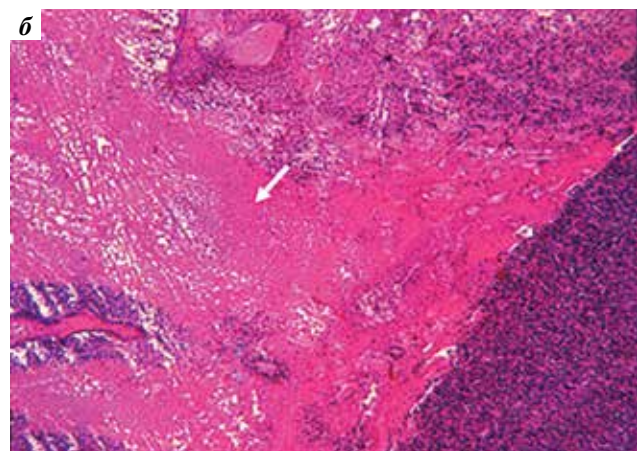
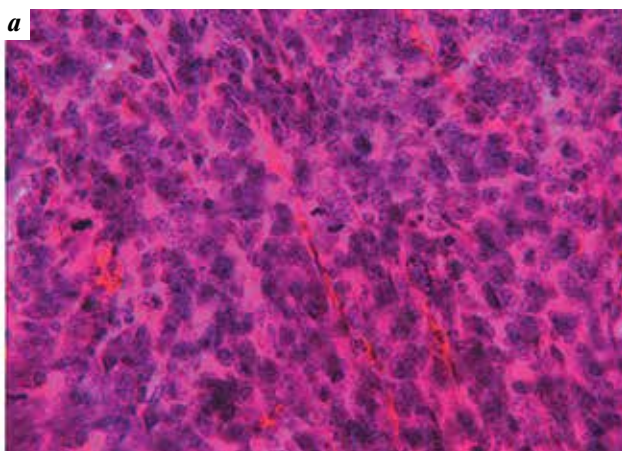


Рис. 6. Периферические срезы опухолей мышечной 1-й группы: а (×40) – plethora гемокapилляров; полиморфизм опухолевых клеток; б (×10) – фиброзная капсула (↑)

Fig. 6. Peripheral sections of tumors from mice from group 1: а (×40) – plethora of hemocapillaries; polymorphism of tumor cells; б (×10) – fibrous capsule (↑)

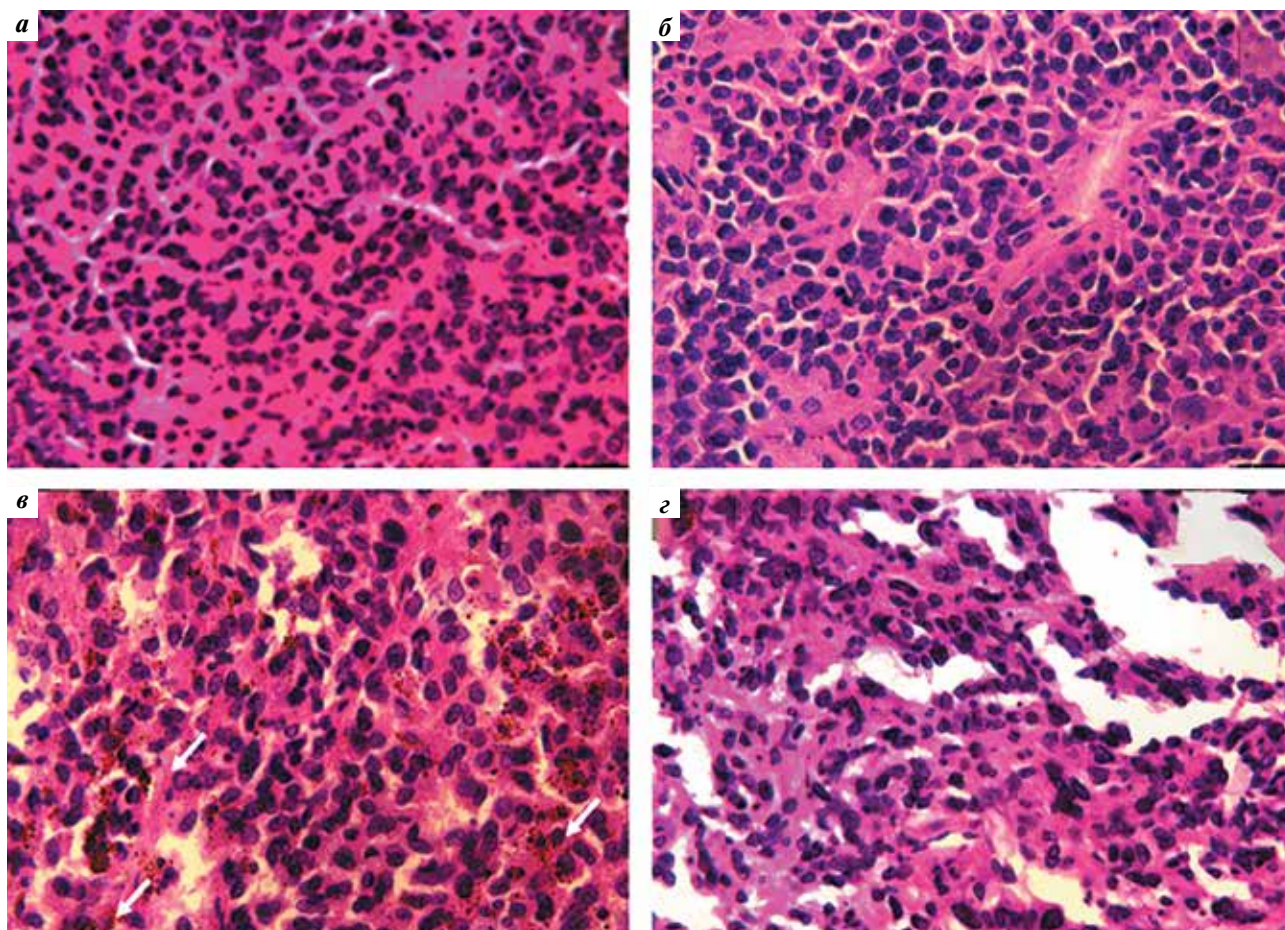


Рис. 7. Центральные срезы опухолей мышей 1–4 (а–г) групп ($\times 40$): а – характерная гистологическая картина опухоли; клетки с размытыми краями овальной полосовидной формы; б – слабый полиморфизм; в – слабый полиморфизм, участки опухоли с гранулами бурого пигмента (\uparrow); г – выраженный полиморфизм, ядра разного размера и формы, фактическое отсутствие гранул бурого пигмента в межклеточном пространстве

Fig. 7. Central sections of tumors from mice of groups 1–4 (a–г) ($\times 40$): а – characteristic histological picture of the tumor; cells with blurred edges, oval, stripe-shaped; б – weak polymorphism; в – weak polymorphism, tumor areas with brown pigment (\uparrow); г – pronounced polymorphism, nuclei of different sizes and shapes, virtual absence of brown pigment granules in the intercellular space

(НЧ), разные по величине (рис. 8, а). Вероятно, НЧ были интернализированы в цитоплазму клеток, а не адгезированы на их поверхности, поскольку при микроскопии они располагались преимущественно в пределах клетки, а не на ее периферии, и имели одинаково четкие с ядерными структурами края, что указывает на то, что они располагаются на одном фокусном расстоянии, вместе с тем отмечено скопление НЧ у опухолевой капсулы, которая приобретала бурый оттенок (рис. 8, б).

4-я – радиотерапия + внутривенное введение НЧ, «РТ + в/в» (рис. 7, г): внутри опухоли не наблюдалось локальных скоплений агрегатов НЧ в межклеточном пространстве (в отличие от 3-й группы) – предположительно, эффективность НЧ была обусловлена фактом их поглощения без агрегирования, что делает их труднодетектируемыми в гистологическом препарате. Присутствовали многочисленные нарушения

гемомикроциркуляции и расширенные гемокapилляры на периферии опухоли (рис. 8, в).

Как при внутриопухолевом, так и при внутривенном введении НЧ наблюдали динамическое уменьшение толщины капсулы опухоли, что, вероятно, вызвано затруднением ее кровоснабжения за счет захвата НЧ структурами опухоли. Задачу детекции НЧ впоследствии будет возможно решить проведением атомно-абсорбционного анализа образцов опухоли (в репрезентативных точках) и их сопоставлением по количественному содержанию железа. В каком объеме существует кумуляция НЧ в клетках опухоли – предстоит выяснить.

Обсуждение

Мы предполагаем, что наблюдаемые эффекты могут относиться к радиосенсибилизации НЧ оксида железа, т. е. повышению восприимчивости опухоли

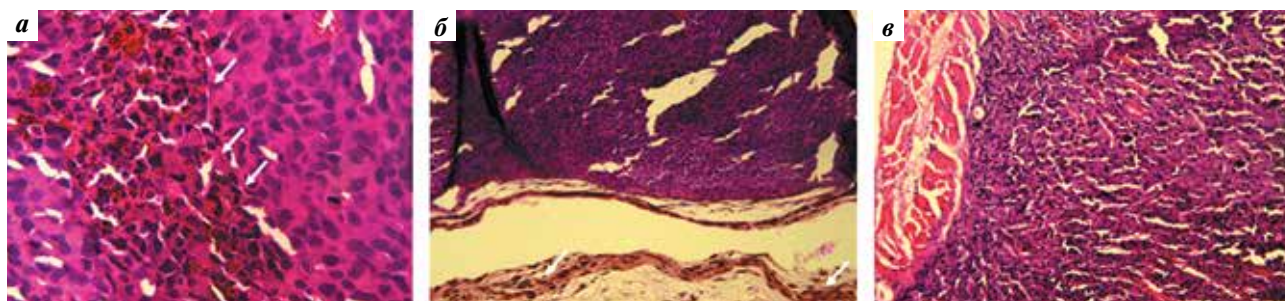


Рис. 8. Микрофотографии опухолей мышей 3-й и 4-й групп: а ($\times 40$) – участок опухоли с высокой концентрацией гранул бурого пигмента (\uparrow); б ($\times 10$) – периферический участок опухоли за пределами зоны с высокой концентрацией гранул бурого пигмента: в клетках пигмента нет, однако капсула и близлежащие к опухоли ткани окрашены в бурый цвет (\uparrow); в ($\times 10$) – истончение капсулы опухоли мыши, снижение ее васкуляризации

Fig. 8. Tumor microphotographs of mice from groups 3 and 4: а ($\times 40$) – tumor area with a high concentration of brown pigment granules (\uparrow); б ($\times 10$) – peripheral tumor area outside the zone with a high concentration of brown pigment granules: no pigment in cells, but the capsule and tissues adjacent to the tumor are colored brown (\uparrow); в ($\times 10$) – thinning of the mouse tumor capsule, decreased vascularization

к облучению [22, 23]. Сенсибилизация ЛТ НЧ оксида железа опосредована в первую очередь повышением количества свободных радикалов за счет увеличения локализованной эмиссии вторичных электронов из НЧ (реакции Фентона и Габера–Вейса) [11, 12]. Более того, более низкий рН среды опухоли коррелирует с усиленной стимуляцией высвобождения активных форм кислорода с помощью НЧ оксида железа, поэтому эффект Варбурга в данном случае будет повышать противоопухолевую специфичность. Реакции переноса электронов так или иначе влияют на клеточные процессы опухолевой клетки, способствуя обширному повреждению клеточных органелл, митохондриальному стрессу, иницированию окисления белков и липидов, что в итоге приводит к значительному проценту клеточной гибели по механизму ферроптоза [10, 12]. Стоит также отметить влияние общепризнанного эффекта ППУ НЧ оксида железа опухолевыми клетками. Благодаря эффекту ППУ любые сенсибилизирующие эффекты отмечаются в большей степени в опухолях, хотя бы из-за того, что опухолевые клетки поглощают во много раз больше НЧ, чем здоровые эпителиальные. Наконец, НЧ оксида железа могут способствовать радиочувствительности, влияя на клеточный цикл: либо останавливая его в наиболее радиочувствительной фазе G2/M, либо останавливая репликацию и программируя часть радиорезистентных клеток S-фазы на смерть [24]. При

этом радиотерапия и НЧ оксида железа усиливают друг друга по повреждающему эффекту внутри фазы, продолжая подвергать клетки окислительному стрессу и провоцировать ферроптоз. В данном случае все описанные эффекты имеют предположительный характер и требуют изучения на молекулярном уровне; проведенное исследование дало начало поиску эффективных модификаций, так как существует необходимость обеспечить лучшее биораспределение частиц внутри опухоли, которое будет возможно от начала до конца контролировать после введения. Наряду с описанными эффектами для НЧ оксида железа можно использовать принцип магнитной гипертермии, что обеспечит повышенную эффективность доставки и соответствующее усиление целенаправленного действия.

Заключение

Исследуемый НП оксида железа Fe^{2+}/Fe^{3+} повышал способность ЛТ ингибировать рост опухоли при внутривенном введении и последовательном облучении экспериментальных мышей с рабдомиосаркомой, эффект сохранялся в течение 2 нед комбинированной противоопухолевой терапии. После исследования молекулярной динамики НП может быть рассмотрен как платформа для конъюгирования с терапевтическими молекулами в рамках повышения эффективности первичного курса ЛТ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Koksharov Y.A., Gubin S.P., Taranov I.V. et al. Magnetic nanoparticles in medicine: progress, problems, and advances. *J. Commun Technol Electron* 2022;67(2):101–16. DOI: 10.1134/S1064226922020073
- Chavali M.S., Nikolova M.P. Metal oxide nanoparticles and their applications in nanotechnology. *SN Appl Sci* 2019;1(6):607. DOI: 10.1007/s42452-019-0592-3
- De Leo V., Milano F., Agostiano A., Catucci L. Recent advancements in polymer/liposome assembly for drug delivery: from surface modifications to hybrid vesicles. *Polymers (Basel)* 2021;13(7):1027. DOI: 10.3390/polym13071027
- Zhao S., Yu X., Qian Y. et. al. Multifunctional magnetic iron oxide nanoparticles: an advanced platform for cancer theranostics. *Theranostics* 2020;10(14):6278–309. DOI: 10.7150/thno.42564
- Gerlowski L.E., Jain R.K. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc Res* 1986;31(3):288–305. DOI: 10.1016/0026-2862(86)90018-x
- Matsumura Y., Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986;46(12 Pt 1):6387–92. PMID: 2946403
- Mai T., Hilt J.Z. Magnetic nanoparticles: reactive oxygen species generation and potential therapeutic applications. *J Nanopart Res* 2017;19(7):253. DOI:10.1007/s11051-017-3943-2
- Fernández-Acosta R., Iriarte-Mesa C., Alvarez-Alminaque D. et al. Novel iron oxide nanoparticles induce ferroptosis in a panel of cancer cell lines. *Molecules* 2022;27(13):3970. DOI: 10.3390/molecules27133970
- Rodríguez-Torres M.P., Acosta-Torres L.S., Diaz-Torres L.A. Heparin-based nanoparticles: an overview of their applications. *J Nanomater* 2018;8:1–8. DOI: 10.1155/2018/9780489
- Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. *Cancer Statistics, 2022*. *CA Cancer J Clin* 2022;72(1):7–33. DOI: 10.3322/caac.21708
- Martin-Giacalone B.A., Weinstein P.A., Plon S.E., Lupo P.J. Pediatric rhabdomyosarcoma: epidemiology and genetic susceptibility. *J Clin Med* 2021;10(9):2028. DOI: 10.3390/jcm10092028
- Lammers G., van de Westerlo E.M., Versteeg E.M. et. al. A comparison of seven methods to analyze heparin in biomaterials: quantification, location, and anticoagulant activity. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17(6):669–76. DOI: 10.1089/ten.TEC.2011.0010
- NANOTRAC Flex. Application Note. URL: <https://www.microtrac.com/ru/products/dynamic-light-scattering/nanotracs-flex/>
- Shiramata Y. Micro-area X-ray diffraction measurement by SmartLab μ HR diffractometer system with ultra-high brilliance microfocus X-ray optics and two-dimensional detector HyPix-3000. URL: https://www.rigaku.com/newsletters/mabu/march2016/RigakuJournal_XRD.pdf
- Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Ч. I. М.: Гриф и К, 2012. Mironov A.N. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Edited by A.N. Mironov. Part One. Moscow: Grif i K, 2012. (In Russ.)
- Fakhardo A., Anastasova E., Makarov V. et al. Heparin-coated iron oxide nanoparticles: application as a liver contrast agent, toxicity and pharmacokinetics. *J Mater Chem B* 2022;10(38):7797–807. DOI: 10.1039/d2tb00759b
- Edmondson E.F., Hunter N.R., Weil M.M., Mason K.A. Tumor induction in mice after localized single- or fractionated-dose irradiation: differences in tumor histotype and genetic susceptibility based on dose scheduling. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015;92(4):829–36. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2015.03.002
- Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общ. ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. С. 637–51. Treshhalina, E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.V. et al. Methodological guidelines for the study of the antitumor activity of pharmacological substances. In the book: Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Ed. prof. R.U. Khabriev. Moscow: Medicina, 2005. P. 637–51. (In Russ.)
- Routine Mayer's hematoxylin and eosin stain (H&E). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology (third edition). URL: http://tvmouse.ucdavis.edu/bcancercd/52/prcl_HandE.html
- Sun H., Jiao R., An G. et al. Influence of particle size on the aggregation behavior of nanoparticles: Role of structural hydration layer. *J Environ Sci (China)* 2021;103:33–42. DOI: 10.1016/j.jes.2020.10.007
- Bogdan N., Rodríguez E.M., Sanz-Rodríguez F. et. al. Bio-functionalization of ligand-free upconverting lanthanide doped nanoparticles for bio-imaging and cell targeting. *Nanoscale* 2012;4(12):3647–50. DOI: 10.1039/c2nr30982c
- Hauser A.K., Mitov M.I., Daley E.F. et. al. Targeted iron oxide nanoparticles for the enhancement of radiation therapy. *Biomaterials* 2016;105:127–35. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.032
- Shestovskaya M.V., Luss A.L., Bezborodova O.A. et. al. Iron oxide nanoparticles in cancer treatment: cell responses and the potency to improve radiosensitivity. *Pharmaceutics* 2023;15(10):2406. DOI: 10.3390/pharmaceutics15102406
- Wu J, Sun J. Investigation on mechanism of growth arrest induced by iron oxide nanoparticles in PC12 cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2011;11(12):11079–83. DOI: 10.1166/jnn.2011.3948

Благодарность

Авторы выражают благодарность коллегам из химико-биологического кластера ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО».

Acknowledgments

The authors express their gratitude to colleagues from the chemical and biological cluster of the ITMO University.

Вклад авторов

М.В. Шестовская, А.Л. Лусс: получение и анализ экспериментальных данных, написание текста рукописи;

В.В. Макаров, В.С. Юдин, А.А. Кескинов: разработка дизайна исследования, редактирование текста.

Author's contribution

M.V. Shestovskaya, A.L. Luss: obtaining data and analysis; writing the manuscript;

V.V. Makarov, V.S. Yudin, A.A. Keskinov: research design development, editing the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.В. Шестовская / M.V. Shestovskaya: <https://orcid.org/0000-0001-5438-1273>

А.Л. Лусс / A.L. Luss: <https://orcid.org/0000-0001-8539-0252>

В.В. Макаров / V.V. Makarov: <https://orcid.org/0000-0001-9495-0266>

В.С. Юдин / V.S. Yudin: <https://orcid.org/0000-0002-9199-6258>

А.А. Кескинов / A.A. Keskinov: <https://orcid.org/0000-0001-7378-983X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Федерального медико-биологического агентства в рамках государственного задания № 388-00154-21-00.

Funding. The work was carried out with the support of the Federal Medical and Biological Agency within the framework of State Assignment No. 388-00154-21-00.

Соблюдение правил биоэтики

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» Сибирского отделения Российской академии наук (заключение Р-02-11.2020-14).

Compliance with bioethics

The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for research and other scientific aims. The study protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (assessment P-02-11.2020-14).

Статья поступила: 27.09.2023. Принята в печать: 12.08.2024. Опубликовано онлайн: 00.00.2024.

Article received: 27.09.2023. Accepted for publication: 12.08.2024. Published online: 00.00.2024.