

**ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ИПМИ В
СОЧЕТАННОМ ДЕЙСТВИИ С ДОКСОРУБИЦИНОМ IN VITRO**Е. А. Просекина

Научный руководитель: к.б.н., с.н.с. М.А. Булдаков

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: elizaveta.prosekina@gmail.com**ANTITUMOR THERAPY EFFICIENCY OF DIFFERENT TYPES OF NANOSECOND PULSE-
PERIODIC MICROWAVE RADIATION IN COMBINATION WITH DOXORUBICIN IN VITRO**E. A. Prosekina

Scientific supervisor: PhD. M. A. Buldakov

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: elizaveta.prosekina@gmail.com

Abstract. It is known that the action of high-amplitude electric pulses can significantly increase the permeability of cell membranes due to the formation of pores in them (electroporation). The aim of this research was to study the possibility of forming electropores in membranes of tumor cells by means of a non-invasive method using nanosecond microwave pulses for effective delivery of chemotherapeutic agents to the cell. The HeLa cell line was used as a model object. Doxorubicin was used as a chemotherapeutic drug in various concentrations: 0.5, 1.0 and 2.5 μM . Radiation was carried out on two sources of pulsed-periodic microwave radiation, characterized by different parameters. It was found that, 24 hours after exposure at pulse repetition rates of 13 and 16 Hz in combination with doxorubicin, there was an increase in inhibition of tumor cell proliferation by 30 and 40 %, respectively.

Введение. В последние годы активно изучается устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим агентам [1]. Выявлен феномен «ускользания» опухолевой клетки из-под действия химиопрепарата, так называемая множественная лекарственная устойчивость. В ряде работ показано, что воздействие высокоамплитудными электрическими импульсами способно значительно увеличивать проницаемость мембран клеток за счёт образования в них пор (электропорация) [2]. Увеличение проницаемости клеточных мембран, позволяет увеличивать количество доставляемых химиопрепаратов в клетку. Помимо этого известно, что воздействия микроволновых излучений в импульсном режиме (ИПМИ), когда частоты повторения импульсов не превышают 30 Гц, вызывает биологические эффекты, значительно отличающиеся от неимпульсных [3].

Также в последние годы внимание исследователей привлекают эффекты, вызываемые импульсно-периодическим высокочастотным излучением (ИПВЧ) в биологических объектах. В частности, было показано, что воздействие ИПВЧ может приводить изменению структуры митохондриальной мембраны, нарушению целостности её липидного матрикса и открытию МРТ-пор, которые играют роль пускового фактора апоптоза [4]. До сих пор остаются неясными механизмы влияния ИПВЧ на нормальные и опухолевые клетки. В этом плане становится важным изучение возможности формирования электропор

в мембранах опухолевых клеток неинвазивным методом с помощью наносекундных микроволновых импульсов для эффективной доставки химиопрепарата в клетку.

Материалы и методы. В качестве модельного объекта использовалась клеточная линия *HeLa*. Клетки культивировались в пластиковых чашках Петри по стандартной технологии, процедуру облучения осуществляли в пластиковых пробирках. В качестве химиопрепарата, обладающего цитостатическим действием, использовали доксорубин в различных концентрациях: 0,5, 1,0 и 2,5 мкМ.

Облучение проводили на двух источниках:

1) Источник импульсно-периодического микроволнового излучения – лабораторный генератор на основе магнетрона «МИ-505», разработанный и изготовленный в Институте сильноточной электроники СО РАН (Томск). Клетки подвергались воздействию ИПМИ с несущей частотой 10 ГГц, длительностью импульсов 70 нс, частотой повторения импульсов 10, 13, 16 Гц и пиковой плотностью потока мощности (пППМ) 1500 Вт/см². Время облучения ограничивалось количеством импульсов (4000 импульсов за сеанс).

2) Источник наносекундных высокочастотных и униполярных импульсов электрического поля (ИПВЧ). Амплитуда импульсов составляла 36 кВ/см, несущая частота от 0,6 до 1,0 ГГц, длительность 25 нс, частота повторения импульсов 13 Гц. Количество импульсов за сеанс ограничивалось от 1000 имп. до 4000 имп. в различных сочетаниях. Пробирки с клеточной суспензией помещались в центр волновода, где амплитуда электрического поля имеет максимальное значение. Контрольные клетки подвергались всем тем же процедурам, что и экспериментальные, за исключением фактора облучения.

Оценку пролиферативной активности и выживаемости клеток на первые сутки проводили с помощью МТТ-теста. Метод заключается в способности живых клеток превращать растворимый желтый бромид (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формазана (МТТ-ф). Нежизнеспособные мёртвые клетки такой способностью не обладают. Оптическую плотность клеточной суспензии измеряли на планшетном спектрофотометре Thermo Scientific (США) на длине волны 620 нм.

Все показатели анализировались в зависимости от параметров излучения (частоты повторения импульсов, количества воздействующих импульсов и напряженности электрического поля). Статистическая значимость различия между показателями облученных и контрольных клеток оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты. Пролиферативная активность клеток в разных экспериментах была различной. Эффект воздействия зависел от частоты повторения импульсов, а также от сочетанного воздействия ИПМИ и доксорубина.

После воздействия излучением с частотой повторения импульсов 13 Гц наблюдается снижение пролиферативной активности на 30% по сравнению с контролем. При этом эффект усиливается при сочетанном воздействии с доксорубином с концентрациями 1 и 2,5 мкМ

После облучении с частотой повторения импульсов 16 Гц был найден наиболее выраженный эффект ингибирования клеточной пролиферации – около 40%. Увеличение концентрации ДР в культуре клеток приводит к еще более выраженному торможению клеточного роста. При этом эффект отмечается даже при использовании самой маленькой концентрации ДР – 0,5 мкМ, чего не наблюдалось при использовании других частот.

При использовании ИПВЧ эффекта усиления ингибиции клеточной пролиферации не было обнаружено, что свидетельствует о поиске новых режимов для этого вида излучения.

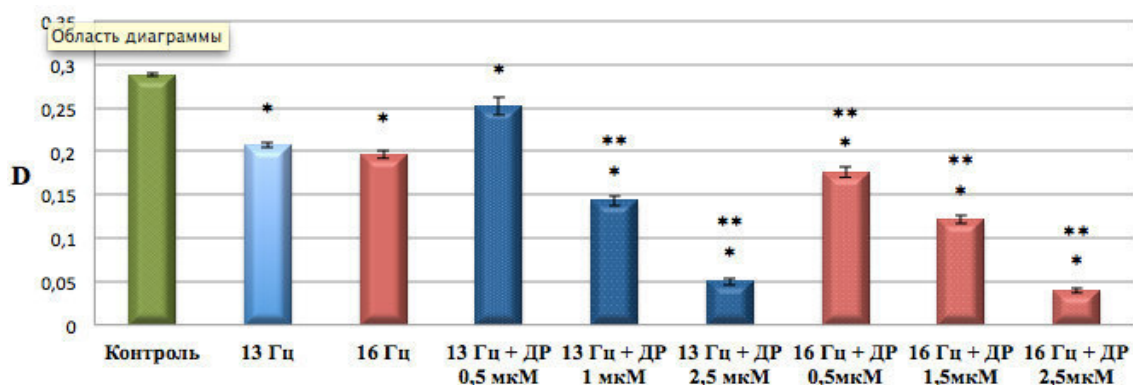


Рис. 1. Сочетанное действие наносекундных импульсных микроволн на пролиферативную активность опухолевых клеток. Примечание: D – оптическая плотность; ДР – доксорубицин (концентрация в микромолях); * – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»; ** – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с группами облучения ИПМИ с частотами 13 и 16 Гц, соответственно

Заклучение. Исходя из имеющихся литературных данных, можно предположить, что одним из возможных механизмов усиления цитостатического действия доксорубицина на опухолевые клетки посредством ИПМИ может являться способность наносекундных микроволновых импульсов в зависимости от частот повторения индуцировать процесс электропорации. Образующиеся электропоры, по-видимому, должны увеличивать поступление доксорубицина в опухолевые клетки, что, в свою очередь, оказывает более пролонгированное действие в отношении молекул ДНК, являющиеся мишенью для доксорубицина. Полученные результаты открывают перспективу для дальнейшего экспериментального исследования способности ИПМИ усиливать пролонгированное действие доксорубицина на опухолевые клетки. А это, в свою очередь, может быть использовано для разработки новой инновационной технологии неинвазивной низкодозовой лучевой терапии злокачественных новообразований, повышающей эффективность лекарственной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блохин Д. Ю. Механизмы формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Клиническая онкогематология. – 2009. – № 1. – С. 167-175.
2. Pakhomov A. G. et al. (2007). Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. Archives of Biochemistry and Biophysics, no. 1, pp. 109-118.
3. Литвяков Н.В. с соавт. Влияние импульсно-периодического СВЧ-излучения на синтез нуклеиновых кислот в опухолевых клетках // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2005. - № 4. – С. 491-494.
4. Zharkova L. et al. (2017) Mitochondrial respiration inhibition after exposure to UWB pulses as a possible mechanism of antitumor action. IOP Conf. Series: Journal of Physics, no. 830, pp.1-4.