

# Нелінійна кінетика росту пухлин саркоми-45 і зміни просторового хаосу форми злоякісних клітин після впливу механохімічно активованого доксорубіцину, дуже високочастотного опромінювання та їхньої комбінованої дії

В. А. Зінченко, В. Е. Орел<sup>1</sup>, Ю. А. Бєлов<sup>2</sup>, Н. М. Дзятковська<sup>1</sup>, М. Й. Данко<sup>1</sup>,  
А. В. Романов<sup>1</sup>, О. Б. Морозов<sup>1, 2</sup>, О. Ю. Придатко<sup>3</sup>

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

<sup>1</sup>Інститут онкології АМН України  
Вул. Ломоносова, 33/43, Київ, 03022, Україна

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Просп. Глушкова, 2, корп. 6, Київ, 03022, Україна

<sup>3</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. С. Кавецького НАН України  
Вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна  
E-mail: orel@ucr.kiev.ua

---

*Характерними ознаками злоякісних пухлин є, серед іншого, особливості їхньої нелінійної динаміки росту та атипова форма клітин, яку можна якісно оцінити на основі уявлень про детермінований хаос. Проведено порівняльне вивчення нелінійної кінетики розмірів пухлин, просторового хаосу форми та цитологічних змін клітин тварин із саркомою-45 під впливом електромагнітного опромінювання (ЕМО, 40 МГц), протипухлинного антибіотика антрациклінового ряду офіцинального доксорубіцину (ДР) і механохімічно активованого ДР, а також їхніх комбінацій. Найвиразнішу нелінійність кінетики розмірів пухлин саркоми-45 виявлено у тварин контрольної групи (без впливу), у той час як після ЕМО та механохімічно активованого ДР вона була мінімальною. Форми пухлинних клітин контрольної групи тварин, як і найураженіших після дії механохімічно активованого ДР та ЕМО, мали найбільший просторовий хаос. Зроблено припущення, що це пов'язано з особливостями змін детермінованого молекулярного хаосу в пухлинних клітинах, викликаних хімічним впливом механохімічно активованого ДР та зовнішнім ЕМО.*

---

*Ключові слова:* клітини саркоми-45, доксорубіцин, електромагнітне опромінювання, хаос.

---

Вступ. Однією з характерних ознак пухлинних клітин є особливості їхньої нелінійної динаміки росту й атипова форма, яка може бути якісно

оцінена за допомогою методів нелінійної динаміки на основі застосування уявлень про детермінований хаос. Згідно з цими уявленнями, в основі хаотичності детермінованих систем лежить не просто безлад, а властивість набувати ними за певних початкових збурень нестійких траєкторій у про-

© В. А. ЗІНЧЕНКО, В. Е. ОРЕЛ, Ю. А. БЄЛОВ,  
Н. М. ДЗЯТКОВСЬКА, М. Й. ДАНКО, А. В. РОМАНОВ,  
О. Б. МОРОЗОВ, О. Ю. ПРИДАТКО, 2005

сторі, що може призводити до змін нелінійної кінетики росту та структури пухлинних клітин.

Для хіміотерапії злоякісних новоутворень використовують антибіотики антрациклінового ряду, такі як доксорубіцин (ДР), дія якого пов'язана з пригніченням синтезу нуклеїнових кислот. Суттєву роль при цьому відіграють вільнорадикальні процеси, внаслідок яких можуть виникати розриви ДНК і порушення структури та функціональної активності мембран, ендоплазматичного ретикулуму і мітохондрій [1]. Разом з цим відомо, що в результаті механохімічної модифікації деяких антибіотиків можливе підвищення їхньої реакційної здатності за рахунок утворення мікро- та наночасток, додаткового утворення вільних катіонрадикалів і позитивних іонів та зростання адгезивності препарату [2]. Для підвищення ефективності протипухлинної терапії застосовують також і ад'ювантні засоби, які підсилюють дію хіміопрепаратів. Одним із них є нетепловий ефект дії електромагнітного неіонізуючого дуже високочастотного опромінення [3].

Антибластичні засоби частіше за все зв'язуються з певними компонентами клітин, які вони уражують або повністю руйнують, що суттєво впливає на нелінійну динаміку та просторовий хаос форми клітин. При цьому для вивчення кількісних змін використовують показники нелінійної кінетики розмірів пухлин та хаотичності форми клітин [4], а також кількісні цитологічні показники, які відображують рівень збереження життєздатності клітин у біологічній тканині після деструктивних впливів [5]. Досить поширеною є оцінка мітотичної активності пухлини (її зниження), що віддзеркалює ступінь цитотоксичного ефекту використаного агента [6].

Виходячи з того, що найінтенсивніше поглинання електромагнітних хвиль відбувається у мембранах, а поверхня злоякісних клітин має більш виражений негативний заряд внаслідок накопичення аніонів нейрамінової кислоти [7], можна припустити, що цитологічні зміни у злоякісних клітинах при моно- та комбінованій терапії мають свої характерні особливості в нелінійній кінетиці розмірів пухлин та просторового хаосу форми злоякісних клітин.

Тому метою цієї роботи було вивчення нелінійної кінетики розмірів пухлин, просторового хаосу форми та порівняльний аналіз цитологічних змін пухлинних клітин тварин з саркомою-45 під

впливом електромагнітного опромінювання (ЕМО) з частотою 40 МГц, антибіотика антрациклінового ряду офіціального ДР і механохімічно активованого ДР, а також їхніх комбінацій.

**Матеріали і методи.** *Тварини та пухлини.* Досліди проводили на 120 неінбредних щурах масою  $110 \pm 20$  г розведення віварію Інституту онкології АМН України. Трансплантування саркоми-45 здійснювали підшкірною ін'єкцією у ділянку задньої кінцівки 20 % суспензії пухлинних клітин. Тварин поділяли на шість груп: 1-ша група — контрольна (без опромінення і введення препарату); 2-га група — ЕМО; 3-тя група — введення офіціального ДР; 4-та група — введення механохімічно активованого ДР; 5-та група — ЕМО та введення офіціального ДР; 6-та група — ЕМО та введення механохімічно активованого ДР.

**Терапія.** Для локального 20-хв ЕМО тварин використовували апарат ДВЧ з рамковим випромінювачем діаметром 3 см, розроблений Мединцем [2]. Частота випромінювання складала 40 МГц при питомому значенні поглиненої потужності 260 Вт/кг. Електрична напруженість поля на відстані 5 см від центра площини рамки-випромінювача становила 200 В/м; магнітна напруженість у площині рамки — 72 А/м. Тверду форму препарату механічно активували в мікрівібромліні ММВЕ-0,005 («Гефест», Росія) з інтенсивністю підводу механічної енергії 20 Вт/г протягом 5 хв. Протипухлинний антрацикліновий антибіотик ДР вводили внутрішньочеревинно щурам з саркомою-45 у дозі 1 мг/кг на 4, 6 и 8-му добу після перещеплення пухлини. ЕМО здійснювали одразу після введення ДР. Температура в пухлині не перевищувала  $38,5 \pm 39,5$  °С. Об'єм пухлини заміряли і розраховували відповідно до роботи [8].

**Аналіз нелінійної кінетики розмірів пухлин.** Нелінійну кінетику розмірів пухлин оцінювали згідно з рівнянням

$$\frac{dx}{dt} = \varphi(x + x_0)(1 - x), \quad (1)$$

де  $\varphi$  — константа — фактор росту;  $x = \frac{\Phi - \Phi_0}{\Phi_\infty - \Phi_0}$  — відносний приріст пухлини до моменту часу  $t$ ;

$x_0 = \frac{\Phi_0}{\Phi_\infty - \Phi_0}$  — відносний розмір пухлини у момент часу  $t = 0$ ;  $\Phi_\infty$  і  $\Phi_0$  — відповідно граничний та початковий об'єм пухлини;  $\Phi$  — об'єм пухлини у момент часу  $t$  [9].

Розв'язок рівняння (1) має вигляд

$$\Phi = \Phi_0 + \Phi_0 \cdot \frac{e^{\varphi \frac{\Phi_\infty - \Phi_0}{\Phi_0} t} - 1}{1 + \frac{\Phi_0}{\Phi_\infty - \Phi_0} \cdot e^{\varphi \frac{\Phi_\infty - \Phi_0}{\Phi_0} t}} \quad (2)$$

**Цитологічний аналіз.** Відбитки клітин одержували на 18-ту добу після перещеплення пухлин від щурів усіх піддослідних груп за загальновідомим методом. Фіксували скельця з відбитками у 96° етиловому спирті. Забарвлення гематоксилін-еозином проводили за стандартною методикою. При мікроскопічних дослідженнях оцінювали кількість незмінених клітин у 100 полях зору, серед цих же клітин визначали кількість клітин у стані поділу, а також вираховували відсоток останніх — мітотичний індекс (МІ) [10].

**Аналіз просторового хаосу зміни форми пухлинних клітин.** Контур цифрового зображення відбитку клітини розбивали на малі ділянки однакової

довжини. Просторовою характеристикою кожної ділянки контуру обрано кут між нею та попередньою ділянкою контуру. Використовуючи отримані значення, будували траєкторію у двовимірному псевдофазовому просторі [11]. Просторовий хаос форми клітини оцінювали за допомогою параметра розбіжності *S* побудованої фазової траєкторії. Параметр розбіжності *S* чисельно дорівнює площі фігури, утвореної лінією, яка огинає фазову траєкторію. Детальний опис алгоритму наведено в роботі [12].

**Результати і обговорення.** Результати вивчення впливу ДР і ЕМО на кінетику розмірів пухлин і МІ саркоми-45 представлено на рис. 1 і в табл. 1. Як видно з наведених даних, після ЕМО тварин-пухлиноносіїв нелінійна кінетика об'єму пухлини характеризувалася зменшенням фактора росту  $\varphi$  на 27 % у порівнянні з контролем. Офіційний ДР гальмував ріст саркоми-45, що відобразилося у зменшенні параметра  $\varphi$  на 16 %. ДР збільшував ефект гальмування росту, а фактор росту  $\varphi$  зменшився на 27 % порівняно з контролем. Комбінована дія ЕМО і ДР спричинила вищу протипухлинну активність при використанні механохімічно активованого препарату. Ця тенденція зберігалася протягом усього експерименту. Спостерігалася посилення ефекту гальмування росту пухлини в результаті комбінованої дії ЕМО і механохімічно активованого ДР. При цьому у тварин-пухлиноносіїв фактор росту  $\varphi$  зменшився на 41 % стосовно контролю. Величина показника множинного коефіцієнта кореляції між ефектами протипухлинної дії механохімічно активованого ДР, ЕМО і спільного впливу ЕМО і механохімічно активованого ДР склала 0,94.

На рис. 2 представлено мікрофотоцитограми препаратів саркоми-45 тварин. Аналізуючи стан пухлин після різних впливів, слід зазначити, що в препаратах, отриманих від тварин після дії ДР і

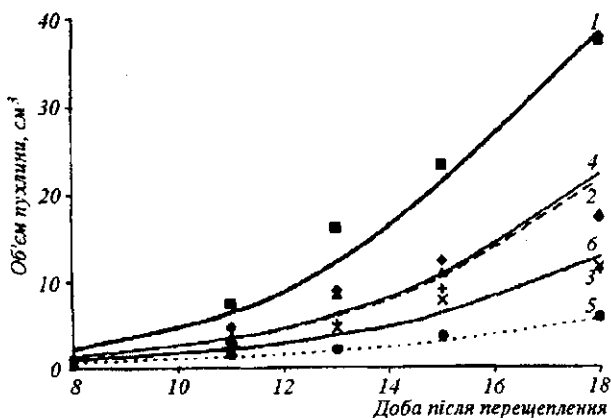


Рис. 1. Кінетичні криві зміни об'єму пухлин саркоми-45 згідно з нелінійною математичною залежністю (формула (2)): 1 — контроль; 2 — офіційний ДР; 3 — механохімічно активований ДР; 4 — офіційний ДР і ЕМО; 5 — механохімічно активований ДР і ЕМО; 6 — ЕМО

Таблиця 1

Вплив доксорубіцину (ДР) та електромагнітного опромінення (ЕМО) на кінетику розмірів пухлин, згідно з рівнянням (2) і мітотичну активність саркоми-45

Параметр	Група тварин після впливу					
	Контрольна	Офіційного ДР	Механохімічно активованого ДР	Офіційного ДР і ЕМО	Механохімічно активованого ДР і ЕМО	ЕМО
Фактор росту $\varphi$	0,39	0,32	0,28	0,32	0,23	0,28
МІ, %	2,9	1,7	1,0	1,1	0,7	1,9

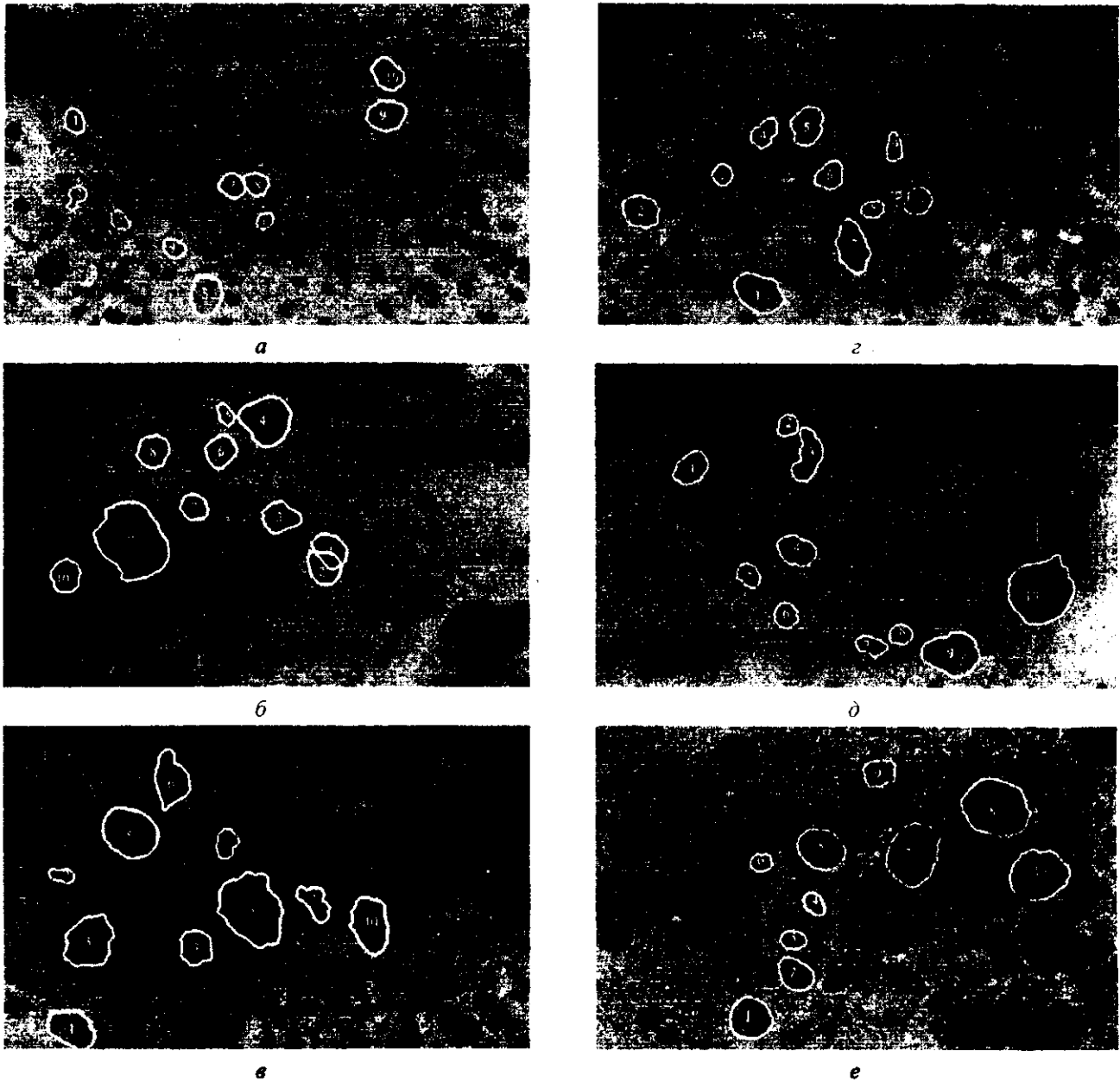


Рис. 2. Мікрофотоцитограми відбитку саркоми-45.  $\times 400$ . Забарвлення гематоксилін-еозином: *a* — контроль, *б* — офіційний ДР; *в* — механохімічно активований ДР; *г* — офіційний ДР та ЕМО; *д* — механохімічно активований ДР та ЕМО; *е* — ЕМО

ЕМО, спостерігалися атипівні зміни в порівнянні з пухлинами контрольної 1-ї групи тварин-пухлинотосіїв. У групі, де тваринам вводили офіційний ДР, відмічено збільшення кількості ядерців та їхніх розмірів. Зустрічалися клітини в стані поділу. Виразений патоморфоз спостерігався в препаратах пухлин тварин, яким вводили механохімічно активований ДР. Знайдено ознаки каріорексису, лізис клітинної стінки, скіпання цитоплазми клітин,

фрагментацію ядер. Майже втричі знизився відсоток МІ. На такому ж рівні знаходився відсоток МІ в групі, де щурам вводили офіційний ДР та здійснювали ЕМО. В препаратах цієї групи спостерігалася зростання ступеня деструкції та гетерогенності клітин порівняно з ефектом застосування одного ЕМО, але зустрічалися клітини в стані мітотичного поділу. Найнижчий МІ і найвираженіший патоморфоз були у групі щурів, яких

Таблиця 2  
 Параметр розбіжності *S* (відн. од.) форми клітин саркоми-45

Група тварин після впливу					
Контрольна	Офіційного ДР	Механохімічно активованого ДР	Офіційного ДР і ЕМО	Механохімічно активованого ДР і ЕМО	ЕМО
2,61	1,61	0,88	1,22	1,51	0,62
3,84	1,10	2,37	2,02	1,81	1,60
2,14	2,95	1,14	2,56	1,95	1,79
1,34	1,34	1,37	2,39	2,36	2,33
1,55	2,99	1,54	1,89	1,81	0,83
2,57	1,07	3,24	1,76	3,04	1,04
1,17	1,25	2,71	2,63	2,07	1,85
5,21	1,07	1,82	2,49	1,70	1,71
1,73	2,60	4,19	1,28	1,31	1,64
1,90	2,11	2,04	1,23	1,54	2,60
<i>M ± m</i>					
2,40 ± 0,40	1,81 ± 0,25	2,13 ± 0,32	1,95 ± 0,18	1,91 ± 0,16	1,60 ± 0,20*

\*Статистично достовірна різниця по відношенню до контрольної групи.

опромінювали на фоні механохімічно активованого ДР. Зросла частота ділянок некрозу. По периферії цитоплазми клітин відмічено виражену вакуолізацію. У препаратах майже всіх піддослідних груп знайдено багато полікаріонів. Особливо велика кількість їх була в препаратах після ЕМО. Також після ЕМО в препаратах спостерігалися збережені клітини з низьким ступенем деструкції, багато полікаріонів і виражений поліморфізм. Середня площа цих клітин була в 3 рази більшою, ніж злоякісних клітин тварин-пухлиноносіїв з контрольної групи.

У табл. 2 наведено зміни параметра *S* форми клітин саркоми-45 після впливу механохімічно активованого ДР, ЕМО та їхньої комбінованої дії. Найзначущий параметр *S*, тобто з найбільш порізаною поверхнею і хаотичною формою пухлинних клітин, спостерігався у контрольній групі щурів. Дещо нижчим він був у пухлинних клітинах після комбінованого впливу механохімічно активованого ДР та ЕМО. Найменший параметр *S* зафіксовано у клітин саркоми-45 після ЕМО. Для пухлинних клітин після впливу офіційного ДР та комбінованого впливу ЕМО й ДР подібні показники мали проміжну величину.

Порівнюючи результати вивчення впливу ДР і ЕМО при фізіологічній температурі на кінетику

розмірів пухлин з даними цитологічних досліджень та розрахунків просторового хаосу форми клітин, слід відмітити наступні тенденції. Нелінійна кінетика росту пухлин, розрахунки просторового хаосу та якісні візуальні цитологічні дослідження і кількісні показники *MI* досить добре коригують між собою, однозначно демонструючи найвиразніший ефект впливу комбінованої дії механохімічно активованого ДР та ЕМО. При цьому зафіксовано найбільшу нелінійність у кінетиці розмірів пухлин контрольної групи (без впливу), у той час як після ЕМО та механохімічно активованого ДР вона була мінімальною.

Може здатися, що результати розрахунків просторового хаосу форми клітин дещо неоднозначні. Але й вони досить гармонічно відображають вищезгадану тенденцію кінетичних та цитологічних досліджень. Звичайно, що форма клітин контрольної групи тварин, як і найураженіших під впливом механохімічно активованого ДР та ЕМО пухлинних клітин, має найбільший просторовий хаос. Дія офіційного ДР та комбінований вплив офіційного ДР та ЕМО призводять до проміжних змін просторового хаосу клітин. Дещо несподіваним було те, що ЕМО викликаючи суттєве зменшення середнього діаметру пухлин, має доволі великий *MI* та найменший просторовий хаос на

поверхні клітин. Напевне, це пов'язано з принциповими відмінностями детермінованого молекулярного хаосу в пухлинних клітинах, спричиненими особливостями внутрішнього хімічного впливу механохімічно активованого ДР та зовнішнього ЕМО (40 МГц) при фізіологічній температурі тварин з саркомою-45 [13].

**Висновок.** Найвиразніший ефект впливу комбінованої дії механохімічно активованого ДР та ЕМО за фізіологічної температури супроводжується найбільшим змінами в нелінійній кінетиці розмірів пухлин саркоми-45 та просторового хаосу зміни форми її клітин. При цьому вони досить добре корелюють з даними візуальних цитологічних досліджень та кількісними показниками МІ пухлинних клітин.

V. A. Zinchenko, V. E. Orel, Yu. A. Belov, N. M. Dzyatkovskaya, M. I. Danko, A. V. Romanov, O. B. Morozov, O. Yu. Pridatko

Nonlinear kinetics of tumor volumes and spatial chaos of sarcoma 45 cell shapes after the treatment by mechanically modified doxorubicin, 40 MHz irradiation and their combination

#### Summary

The characteristic features of malignant tumors may be the peculiarities of the nonlinear growth dynamics and atypical cell shapes, which can be qualitatively estimated on the basis of a deterministic chaos conception. The comparative study of nonlinear kinetics of tumor volumes change, spatial chaos of cell shapes and cytological changes of cells in animals with sarcoma-45 under the influence of 40 MHz electromagnetic irradiation (EI), anticancer anthracycline antibiotic official doxorubicin (DR) and mechanochemically activated (MA) DR and their combination was undertaken. The kinetics of sarcoma-45 tumor volumes change in control animals (without any treatment) was the most nonlinear, while after the combined action of EI and MA DR the nonlinearity was minimal. The shapes of tumor cells in control animals as well as of the cells mostly affected by MA DR and EI action have the greatest spatial chaos. Possibly it is a result of changes in deterministic molecular chaos in tumor cells under chemical treatment with MA DR and EI.

Key words: cells of sarcoma-45, doxorubicin, electromagnetic irradiation, chaos

V. A. Зинченко, В. Э. Орел, Ю. А. Белов, Н. Н. Дзятковская, М. И. Данко, А. В. Романов, А. Б. Морозов, О. Ю. Придатко

Нелинейная кинетика роста опухолей саркомы-45 и изменения пространственного хаоса формы злокачественных клеток после влияния механохимически активированного доксорубина, очень высокочастотного облучения и их комбинированного действия

#### Резюме

Характерными признаками злокачественных опухолей являются, среди прочего, особенности их нелинейной динамики

роста и атипичная форма клеток, которую можно качественно оценить на основе представлений о детерминированном хаосе. Проведено сравнительное изучение нелинейной кинетики изменения размеров опухолей, пространственного хаоса формы и цитологических изменений клеток животных с саркомой-45 под влиянием электромагнитного облучения (ЭМО, 40 МГц), противоопухолевого антибиотика антрациклинового ряда официального доксорубина (ДР) и механохимически активированного ДР, а также их комбинаций. Наибольшая нелинейность кинетики размеров опухолей саркомы-45 наблюдалась у животных контрольной группы (без влияния), в то время как после ЭМО и механохимически активированного ДР она была минимальной. Формы опухолевых клеток контрольной группы животных, как и наиболее пораженные влиянием механохимически активированного ДР и ЭМО, имели наибольший пространственный хаос. Сделано предположение, что это обусловлено особенностями изменений детерминированного молекулярного хаоса в опухолевых клетках, вызванных химическим влиянием механохимически активированного ДР и внешнего ЭМО.

Ключевые слова: клетки саркомы-45, доксорубин, электромагнитное облучение, хаос

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Hortobagyi G. N. Anthracyclines in the treatment of cancer // *Drugs*.—1997.—54, N 4.—P. 1—7.
- Todor I. N., Orel V. E., Mikhailenko V. M., Danko M. I., Dzyatkovskaya N. N. Influence of mechanochemically modified doxorubicin and irradiation with frequency 40 MHz on doxorubicin-resistant Guerin's carcinoma // *Exp. Oncol.*—2002.—24.—P. 234—236.
- Polk C. When is a «non-thermal» bioeffect of microwaves really non-thermal? Implications for DNA exposure // *Polish J. Med. Phys. and Eng.*—2001.—7, N 1.—P. 101—108.
- Sedivy K. Fractal tumours: they real and virtual images // *Wien Klin Wochenschr.*—1996.—108, N 17.—P. 547—551.
- Зитарє И. Я. Цитологические аспекты химиотерапии опухолей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.—Рига, 1987.—40 с.
- Окулов В. Б., Зубова С. Г. Адаптивные реакции клетки как основа прогрессии опухолей // *Вопр. онкологии.*—2000.—46, № 5.—С. 505—512.
- Тімінюк В. О., Животова О. М. Біофізика.—Харків: Золоті сторінки, 2001.—161 с.
- Giuliani F. C., Kaplan N. O. New doxorubicin analogs active against doxorubicin-resistant colon tumor xenografts in the nude mouse // *Cancer Res.*—1980.—40.—P. 4682—4687.
- Эмануэль Н. М., Кавецкий Р. Е., Тарусов Б. Н., Сидорик Е. П. Биофизика рака.—Киев: Наук. думка, 1976.—296 с.
- Исаков В. Л., Пинчук В. Г., Исакова Л. М. Современные методы автоматизации цитологических исследований.—Киев: Наук. думка, 1988.—216 с.
- Мун Ф. Хаотические колебания: вводный курс для научных работников и инженеров.—М.: Мир, 1990.—312 с.
- Orel V. E., Romanov A. V., Dzyatkovskaya N. N., Mel'nik Yu. I. The device and algorithm for estimation of the mechanoemission chaos in blood of patients with gastric cancer // *Med. Eng. and Phys.*—2002.—24, N 5.—P. 365—371
- Orel V. E. Хаос и рак, механохимия, механоэмиссия.—Киев: АОЗТ «Телеоптик», 2002.—296 с.

УДК 615.074

Надійшла до редакції 03.03.04