

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

освітній ступінь – магістр

на тему: **«ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ПРЕПАРАТІВ ПОХІДНИХ
1,4-ДИГІДРОПІРИДИНУ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання,
Спеціальність
091 Біологія
Освітньо-наукова програма: Лабораторна
діагностика біологічних систем

Сізик Дарина Юріївна

Керівник Білько Д. І.

кандидат біологічних наук, доцент

Рецензент Стародуб М. Ф.

Магістерська робота захищена
з оцінкою _____

Секретар ЕК Пахаренко М. В.

«09» червня 2020 року

Київ – 2020

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ _____	Стор.
ВСТУП _____	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ _____	7
1.1. Вплив іонізуючого випромінювання на організм _____	7
1.2. Радіопротектори як засоби захисту від іонізуючого випромінювання _____	9
1.3. Природні радіопротектори _____	13
1.4. Основні механізми дії радіопротекторів _____	14
1.4.1. Антиоксидація _____	15
1.4.2. Протизапальні властивості радіопротекторів _____	15
1.4.3. Процеси відновлення ДНК _____	15
1.4.4. Регенерація (кровотворні та імуностимулюючі сполуки) _____	16
1.4.5. Радіозахист на молекулярному рівні _____	16
1.5. Класифікація радіопротекторів _____	17
1.5.1. Церебропротектори _____	19
1.5.2. Ентеропротектори _____	19
1.5.3. Мієлопротектори _____	19
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА _____	21
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ _____	21
2.1. Матеріали та реагенти, необхідні для досліджень _____	21
2.1.1. Витратні матеріали _____	21
2.1.2. Реактиви _____	21
2.1.3. Лабораторний посуд _____	23
2.1.4. Обладнання _____	23
2.1. Підготовка до експерименту _____	24
2.1.1. Обробка боксу _____	24
2.2.1. Автоклавування лабораторного посуду _____	24
2.3. Схема експерименту та об'єкт дослідження _____	25
2.4. Методи оцінки життєздатності клітин в культурі _____	26
2.5. Отримання біомаси та стандартизація концентрації клітин MCF-7 _____	26
2.6. Підготовка робочих розчинів _____	27
2.7. Проведення МТТ-тесту _____	29
2.8. Отримання ДНК-комет та аналіз даних _____	31
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ _____	34
3.1. Оцінка дозозалежного цитотоксичного ефекту препаратів похідних 1,4-дигідропіридину на культуру клітин MCF-7 _____	34
3.1.1. Оцінка осадоутворення _____	34
3.1.2. Цитотоксичний вплив розчинника і контрольних препаратів _____	35
3.1.3. Цитотоксичний вплив досліджуваних препаратів похідних 1,4 дигідропіридину _____	36

3.2. Морфофункціональні показники життєздатності клітин лінії MCF-7 в нормі _____	38
3.3. Морфофункціональні показники життєздатності клітин лінії MCF-7 під впливом препаратів похідних 1,4 дигідропіридин _____	40
3.4. Визначення цитотоксичного впливу контрольних препаратів на ДНК клітин лінії MCF-7 за допомогою методу ДНК-комет _____	42
3.5. Визначення цитотоксичного впливу досліджуваних препаратів за допомогою методу ДНК-комет _____	45
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ _____	48
ВИСНОВКИ _____	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕН

DMEM	– <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
PBS	– фізіологічний розчин у фосфатному буфері (<u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
FBS	– фетальна теляча сироватка (<u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
MTT	– 3-(4,5-ди <u>m</u> етил <u>t</u> іазол-2-іл)-2,5-дифеніл- <u>t</u> етразолію бромід
TAE	– <u>t</u> рис- <u>a</u> цетат- <u>E</u> ДТА
ДМСО	– ди <u>m</u> етил <u>s</u> ульф <u>o</u> ксид
ІВД	– <u>i</u> ндекс <u>v</u> місту <u>D</u> НК у хвості
ІДХ	– <u>i</u> ндекс <u>d</u> овжини <u>x</u> воста

ВСТУП

На сьогодні, незважаючи на міжнародні угоди, неухильно зростає загроза ядерного тероризму й можливого застосування ядерної зброї в міжнародних конфліктах. Все більше зростає ризик позапланового опромінювання професіоналів у випадках радіаційних аварій на підприємствах, пов'язаних із ядерною енергетикою, та атомних електростанціях. Поштовхом для осмислення глобальності проблеми ліквідації наслідків під час застосування радіаційних технологій були аварії на ядерних установках: на Чорнобильській АЕС у 1986 році та на АЕС Фукусіма в Японії у 2011 році. Це загострило проблему захисту всієї біоти від опромінення та зумовило необхідність пошуку препаратів, що захищають як від гострого опромінення, так і від тривалої дії радіації [1-2].

Розрізняють такі види захисту людини від іонізуючого випромінювання: прямий під час дії гострого випромінювання (аварійні ситуації на ядерних підприємствах), пролонгований під час тривалого низькоінтенсивного опромінювання (персонал, що залучений в радіаційній сфері) та профілактика наслідків опромінення, до яких можна віднести радіотерапію онкологічних захворювань [3-6].

До потенційних радіопротекторів висувають ряд вимог, дотримання яких покращує їх терапевтичну дію. Їхня дія має бути вибірковою у захисті нормальних тканин від іонізуючого випромінювання, не захищаючи пухлинні тканини, та повинна мати мінімальну токсичність [7]. У розвинутих країнах не припиняються роботи зі створення нових радіозахисних препаратів. На сьогодні в Україні проводять дослідження нових речовин, які в подальшому матимуть перспективу застосовування як медичних засобів протирадіаційного захисту людей. До препаратів, що мають радіопротекторну дію, відносять препарати похідних 1,4-дигідропіридину, що досліджуються в роботі. Ці препарати мають дуже широкий спектр дії та володіють антиоксидантними, антимуtagenними та радопротекторними

властивостями, тому вони є потенційними об'єктами розробки нових біологічно активних речовин та радіопротекторів.

Робота має на меті дослідження біологічної дії, як радіопротекторних препаратів похідних 1,4-дигідропіридину у культурі клітин аденокарциноми грудної залози людини MCF-7 *in vitro*.

Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

1. Відпрацювати методику ведення культури клітин MCF-7 *in vitro*.
2. Порівняти цитотоксичний і антипроліферативний вплив препаратів похідних 1,4-дигідропіридину на пухлинну клітинну лінію MCF-7 із негативними контролями беномілом та паклітакселом.
3. Проаналізувати цитотоксичність препаратів AV-153-Li (IOS-1262) та Glutapirone за допомогою МТТ-тесту.
4. Дослідити цитотоксичний вплив досліджуваних препаратів на ДНК клітин MCF-7 методом ДНК-комет.
5. Визначити препарат, що володіє найменшими цитотоксичними властивостями.

Об'єкт дослідження: біологічна дія препаратів-похідних 1,4-дигідропіридину.

Предмет дослідження: особливості функціонування клітин MCF-7 у культурі *in vitro* при дії препаратів-похідних 1,4-дигідропіридину.

Роботу було виконано на базі кафедри лабораторної діагностики біологічних систем НаУКМА.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Вплив іонізуючого випромінювання на організм

На сьогодні найперспективнішою та найефективнішою серед всіх способів лікування злоякісних новоутворень є променева терапія, тому дуже великий відсоток хворих для свого лікування піддається впливу іонізуючого випромінювання. Зазвичай, всі говорять про позитивні сторони використання опромінення для лікування, але поряд з потрібно і думати про наслідки його впливу в цілому на організм. Тому за останні роки з'явилося багато публікацій, що стосуються захисту організму від опромінення, адже він є дуже шкідливим для нормальних клітин. Відомо, що вплив опромінення на організм, а саме молекулу ДНК може бути: пряме та опосередковане [8].

Прямий – коли на молекулу ДНК безпосередньо діє опромінення і відбувається їх взаємодія, а у випадку непрямого(опосередкованого) – через вільні радикали кисню (ROS). Раніше було доведено, що ці радикали утворюються з молекул, котрі в постійному режимі оточують молекулу ДНК [9]. Під час цього виду впливу відбувається взаємодія вторинного електрона (утворюється за рахунок рентгенівського фотона) з молекулою ДНК.

Непрямий ефект викликає за допомогою реакції різних продуктів води з молекулою ДНК, адже всі біологічні об'єкти містять до 90% води. До таких сполук відносять: гідроксильні радикали, атоми водню, сольватовані електрони та інші [10-11]. В цьому випадку вторинний електрон реагує не з молекулою ДНК, а молекулою води. Це в подальшому допоможе індукувати пошкодження в структурі молекули ДНК за допомогою того, що в результаті цієї взаємодії утворюється ROS. На рис. 1.1. можна побачити, що гідроксильний радикал може вступати в реакції майже з усіма елементами клітини та має значну окиснювальну здатність. Тому, відповідно, він має найвищу реакційною здатністю в порівнянні з іншими радикалами та є

найсильнішим. Гідроксильні радикали мають найбільший вплив на білки, ліпіди та молекулу ДНК.

Як вже виявилося, опромінення викликає зміни в молекулі ДНК, а це в свою чергу призводить до вивільнення в кров хемокінів, факторів росту, цитокінів та утворення вільних радикалів кисню. Це в свою чергу активізує імунну систему організму та призводить до апоптозу. Вивільнення хемокінів, цитокінів призводить до хронічної фази. Поряд з цим до цієї фази може призвести апоптоз. Гостру фазу запалення продукує активована імунна система з можливим подальшим апоптозом [12-14]. Обидві фази можуть викликати безліч захворювань. Відомо, що гостра фаза зазвичай викликає проліферацію та різні запалення в органах, а хронічна, в свою чергу, пошкодження судин, фіброз, безпліддя та атрофізм (рис. 1.2.).

Вплив іонізуючого випромінювання ділять на гострий та пізній. Гострий також називають раннім і виникає на протязі декількох днів після процесу радіаційного опромінення. Зазвичай він триває навіть до кількох тижнів при цьому викликає апоптоз. Вплив, що використовують вже після опромінення називають пізнім і триває він на протязі тривалого часу. Його дія може тривати протягом років і мати дуже сильний і стійкий вплив.

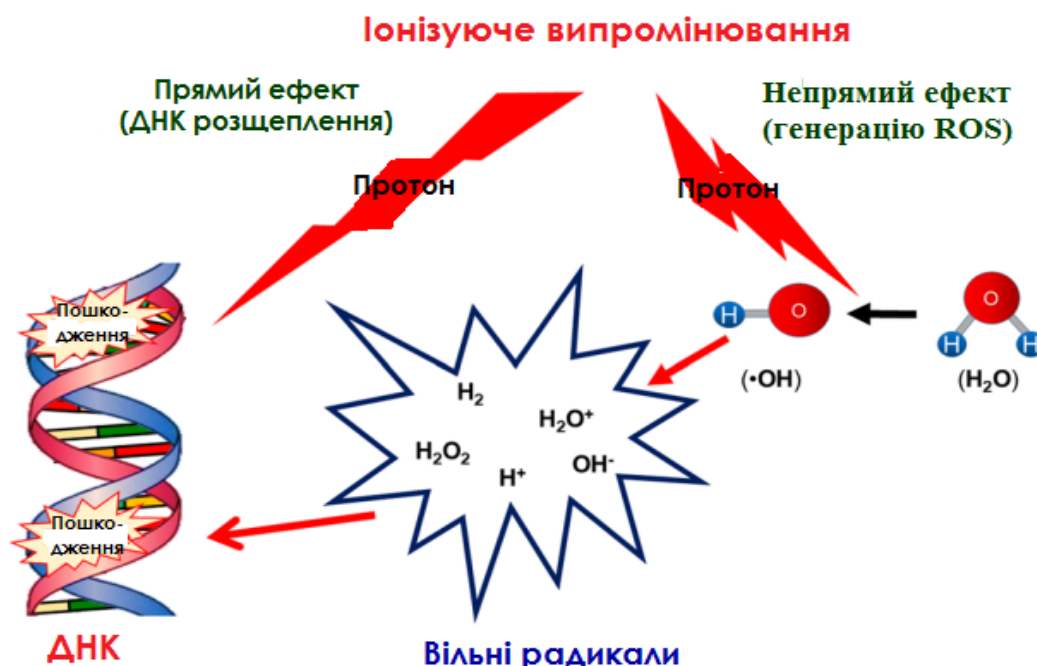


Рис 1.1. Види впливу іонізуючого випромінювання [15].



Рис 1.2. Наслідки іонізуючого опромінення [14].

1.2. Радіопротектори, як засоби захисту від іонізуючого випромінювання

Серед всіх методів лікування злоякісних новоутворень виділяють променеву терапію, вона дозволяє швидко і якісно побороти дане захворювання. Іонізуюче випромінювання допомагає вбити злоякісні клітини за допомогою різних факторів, що були описанні вище. Але поряд з цим стоїть питання про так зване розмежування між дією на пухлинні тканини та злоякісні клітини. На злоякісні пухлини має діяти максимальна доза іонізуючого випромінювання, а на нормальні тканини мінімальна дія, для зменшення побічних ефектів [3]. Але цієї залежності дуже важко досягти,

тому і з'явилася потреба у захисті нормальних клітин від іонізуючого випромінювання.

Реакція на іонізуюче випромінювання може бути досить високою, таку реакцію мають: лімфома, рак шийки матки, простати та інші види. А от наприклад, саркома, меланома мають високу внутрішню резистентність. Радіорезистентність через гіпоксію також є головним питанням. Цю проблему можна подолати за допомогою засобів, що будуть допомагати іонізуючому випромінюванню мати вибіркочу чутливість до злоякісних пухлин і при цьому захищати нормальні тканини від нього [4-5].

Радіопротектори – це сполуки, які використовуються для зменшення пошкодження нормальної тканини, викликаной іонізуючим випромінюванням.

Ці засоби захищають нормальну тканину від згубного впливу іонізуючого випромінювання. За допомогою них можна захистити організм шляхом зниження токсичності на клітини.

Радіаційне опромінення здорової клітини – це неминуха подія, яка може призвести до появи негативного впливу, починаючи від легкої симптоматики до ускладнень, що загрожують життю. Радіаційна токсичність залежить від багатьох факторів, таких як доза, об'ємне фракціонування, загальний час лікування та властива радіочутливість.

Показано, що радіотерапія, променева терапія та протонна променева терапія знижують ці токсичності, а внутрішня радіочутливість клітин є компонентом, який не може бути забезпечений цими технологіями. Ось чому важливі радіопротектори.

Радіопротекторні препарати повинні мати наступні характеристики [3,9]:

1. захищати від прямого і опосередкованого впливу під час опромінення;
2. не повинен захищати пухлинні клітини;
3. повинен мати мінімальну токсичність;
4. легке застосування (введення);

5. легко виводитися з організму.

Відповідно до широкого розповсюдження використання іонізуючого випромінювання, постійно зростає інтерес до захисту всього організму від опромінення. Отже, це дало поштовх до пошуку нових лікарських препаратів, що матимуть радіопротекторну властивість. Її використання допоможе зменшити негативний вплив на ті клітини, котрі не вражені хворобою. За останні роки розробили та створили безліч нових препаратів, котрі застосовуються для захисту, тому виявилася необхідність у створенні класифікації та умов, що допомагатимуть їх розрізнити. Була створена фармакологічна класифікація радіозахисних препаратів відповідно до терміну їх ведення та дії. Отже, дана класифікація включає:

- захисні, а саме радіопротектори;
- терапевтичні;
- пом'якшувачі.

Радіопротектори в основному призначають до використання безпосередньо перед опроміненням, це допоможе запобігти гострому та хронічному впливі. Ведення їх після опромінення не має фармакологічного впливу. Пом'якшувач застосовують для послаблення певних симптомів, ще до їх появи, тобто теоретично вони запобігають їх виникненню. На відміну від радіопротекторів, їх можна використовувати і після опромінення. Терапевтичні засоби, в свою чергу, відрізняються від всіх інших тим, що застосовуються тільки після опромінення. Вони допомагають знизити рівень гострого і токсичного впливу на організм (рис. 1.3.) [3,5].

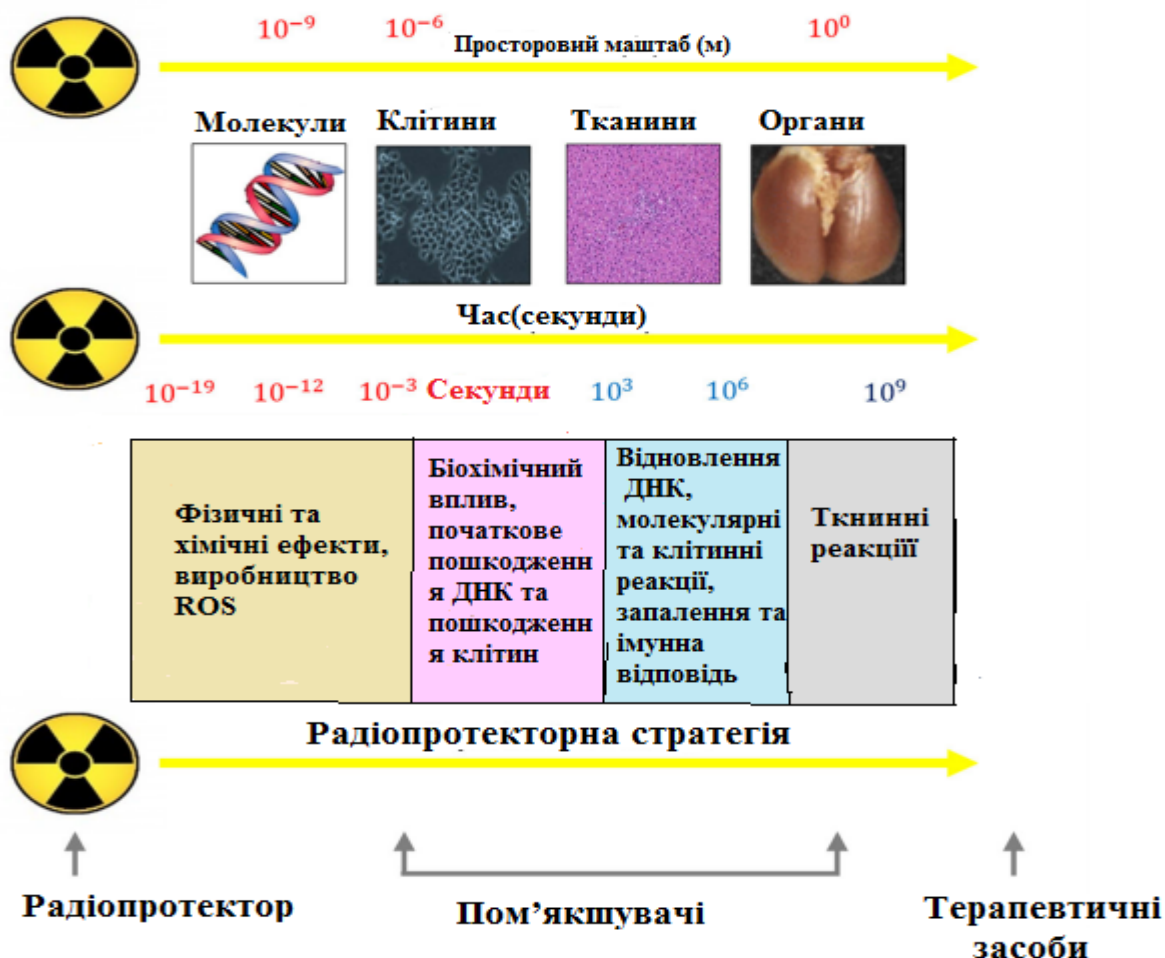


Рис 1.3. Фармакологічна класифікація радіозахисних препаратів [18].

На сьогодні відомо багато природних речовин з радіопротекторними властивостями, та синтезовано безліч синтетичних. Для штучно створених, тобто хімічних радіопротекторів існує ряд обмежень:

- Умовно висока токсичність. Тому дуже актуальним є питання розробки і впровадження малотоксичних препаратів.
- Досить висока вартість в порівнянні з природними. Хоча цей факт є досить відносним і має багато відхилень.
- Великий ряд побічних ефектів в порівнянні з природними сполуками.

Дуже поширеними та широко вживаними є природні сполуки, що використовуються, як радіопротектори. До них можна віднести рослини та фотохімікати. Вони вирізняються низкою цитотоксичністю, тому саме природні сполуки є основними джерелами радіопротекторів на сьогодні.

1.3. Природні радіопротектори

Багато природніх сполук мають сильну і ефективну радіопротекторну властивостями, при цьому незначну токсичність. До них відносяться гормони, полісахариди і навіть вітаміни. Наприклад такі як, b-глюкагон, 5-андростендіол, вітаміни Е, С (рис. 1.4.) [19-23]. Пайнуліном та іншими було досліджено вітамін С, як потенційний сильний, природний радіопротектор. Поряд з ними ж досліджувалися і аргінін, глютамін та деякі хінони. Ними було підтверджено, що вони можуть мати радіопротекторну здатність та незначну цитотоксичність. Але необхідні їх подальші дослідження, для підтвердження теорії про те, що вони є потенційними радіопротекторами. [24]. Цитрином та іншими вченими було досліджено такі як радіопротекторні сполуки флавоноїди та поліеноли та підтверджено про їх ефективність у захисті від опромінення [25-26].

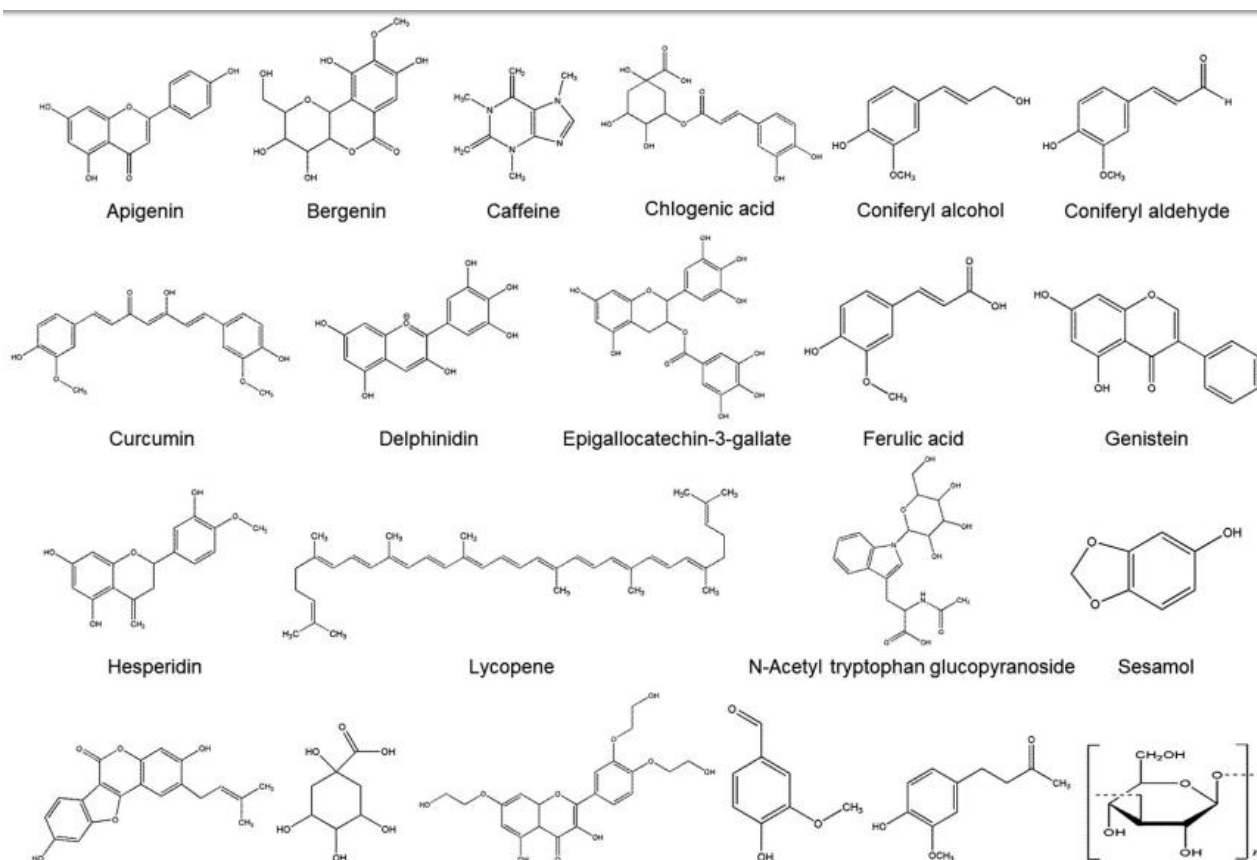


Рис. 1.4. Відомі природі радіопротектори, та їх хімічна структура [26].

1.4. Основні механізми дії радіопротекторів

Як природні, так і синтетичні радіопротектори мають схожі механізми дії та властивості на організм, а саме:

1. антиоксидантний механізм;
2. протизапальні властивості;
3. різні процес відновлення молекули ДНК;
4. регенеративні властивості;
5. радіозахист на молекулярному рівні.

Ці механізми беруть участь у відновленні пошкоджених молекул ДНК, клітин і тканин (рис. 1.5.) [19]. Тому всі радіопротектори, мають високу перспективу у використанні, адже являються ефективними засобами захисту від опромінення.

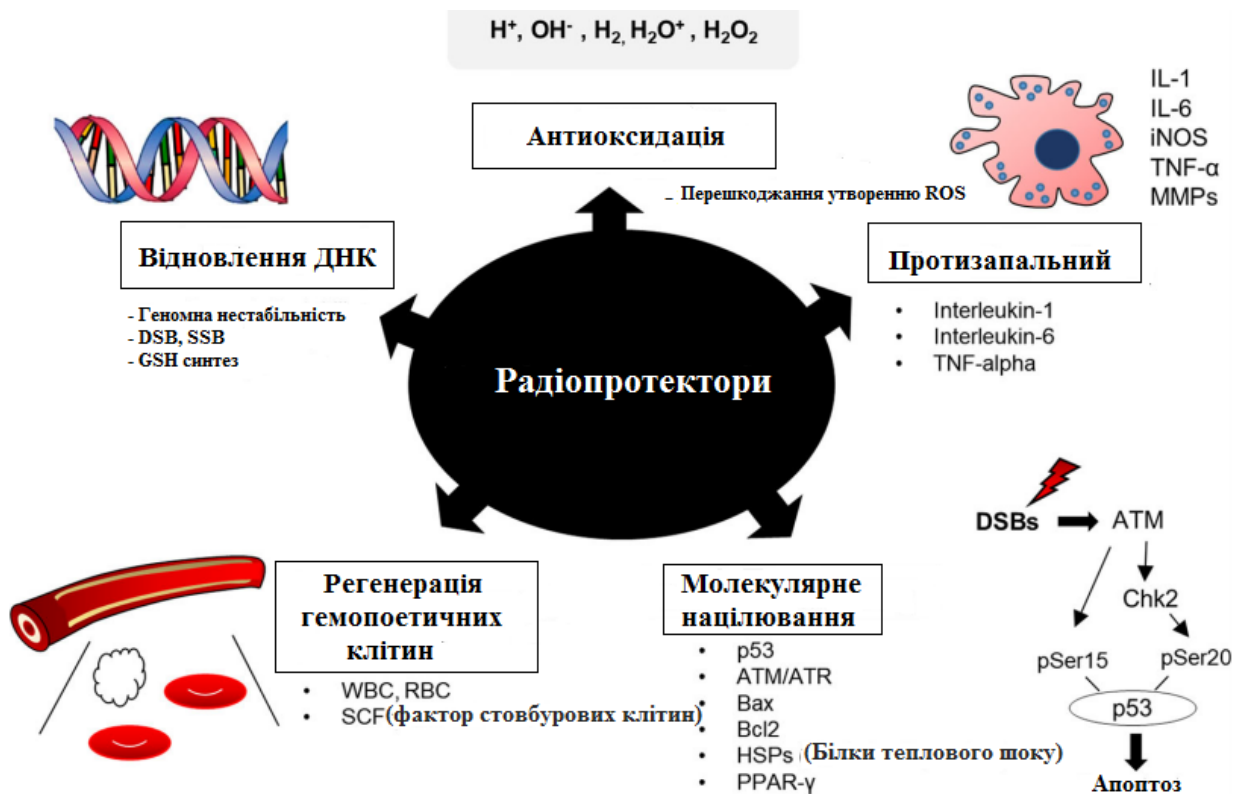


Рис. 1.5. Механізми, що відбуваються в радіопротекторних сполуках. Умовні позначення: SSB - одиночний розрив, DSB-ланцюг - це подвійний розрив, білі клітини - WBC, еритроцити – RBC [19].

1.4.1. Антиоксидация. Вільні радикали (andROS), котрі іонізуюче випромінювання постійно виробляє, завдають значної шкоди організму, а саме клітинам. До пошкоджень, що вони викликають, можна віднести ті, що в молекулі ДНК і це відбувається за рахунок виходу певних фрагментів з її молекули. Також викликає індукцію молекули ДНК, а саме подвійних ланцюгів, що дуже шкодить молекулі ДНК. Викликає різного типу зшивання: ДНК-білок, ДНК-ДНК. Ці зміни в молекулі ДНК призводять до значних негативних впливів, в першу чергу – це геномна нестабільність, що в подальшому призводить до зміни структури білків і в нарешті до загибелі клітин. Багатьма авторами було досліджено, при опроміненні організму стандартною дозою призводить до такої кількості пошкоджень у молекулі ДНК: одониткових - тисяча розривів, подвійних – сорок. А в самій молекулі ДНК – сорок тисяч [27-29]. Радіопротектори, в свою чергу, допомагають перешкодити ці зміни в молекулі ДНК.

1.4.2. Протизапальні властивості радіопротекторів. Відомо, що в процесі дії іонізуючого випромінювання, утворюється імунна відповідь організму на його дію. Було доведено, що після введення в організм радіопротектора, спостерігалася зміна імунної відповіді на опромінення, котрі допомагали зменшити рівень різних захворювань. Відомий такий факт, що після опромінення організму виділяються цитокіни і хемокіни, а саме різні інтерлейкіни (IL-1, IL-6), фактор некрозу пухлин (TNF) та дуже важливий трансформуючий фактор росту b (TGF-b), що індукує іонізуюче випромінювання, та викликає фіброз шкіри і легень [30-31], тому на нього і звертається така велика увага. Отже, використання протизапальних радіопротекторів допомагають врегулювати виділення даних речовин.

1.4.3. Процеси відновлення ДНК. Як вже говорилося, вільні радикали, утворенні опроміненням призводять до багатьох негативних змін, тому радіопротектори використовуються для запобігання утворення цих змін. Але поряд з цим, постає питання про відновлення цих негативних змін в молекулі ДНК. Було припущено, що в одиничних розривах ДНК, в котрих був

відсутній синтез глутатіону під час репарації ДНК, саме глутатіон дав можливість до відновлення. Також було доведено, що активність ДНК-попередників може регулювати рівень всіх дезоксирибонуклеотидів. Серед таких попередників виділяють рибонуклеотид-редуктаза [32]. Аналогічну дію мають всі речовини, котрі мають властивість підвищувати активність ферментів. Отже вони можуть використовуватись в ролі відновлювач ДНК і використовуватися як потенційні радіопротектори.

1.4.4. Регенерація (кровотворні та імуностимулюючі сполуки).

Окрім вище сказаного, іонізуюче випромінювання викликає зміни в лімфоїдній та кровотворній системах, що дуже впливає на організм в цілому [33]. Було доведено, що регенерація змін в цих системах викликана збільшенням кількості різних кровотворних одиниць, котрі викликають стимуляцію імунної системи, а також різні регенерації в цих системах. Отже, як радіопротектори можна використовувати: хемокіни, цитокіни, фактори росту та різноманітні імуномодулятори. Дюмоном та іншими вченими були досліджені такі речовини, що висуваються потенційними радіопротекторами, що стимулюють утворення стовбурових клітин, котрі володіють регенеруючою функцією кісткового мозку: IL-1, TNF- α , еритропоєтин, колоній стимулюючий гранулоцитарно- макрофагальний фактор та інші [34-35]. Отже, як радіопротектори можна використовувати речовини, що будуть регулювати утворення стовбурових клітин.

1.4.5. Радіозахист на молекулярному рівні. За останні роки з'явилися багато публікацій, що дають розуміння про те, як опромінення призводить до апоптичних процесів. Також багато досліджень на тему того, що саме відбувається в організмі після опромінення, для того, щоб в подальшому зрозуміти як саме діяти в процесі відновлення після його застосування. Відомо, що індукцією апоптозу реалізується ATR або ATM проєїнкінази (ATM -Ataxia Telangiectasia Mutated, ATR Ataxia Telangiectasia Rad3-Related) та супресор пухлини білок p53, котрі утворюються відповідь на появу пошкодження ДНК. Вони провокують апоптоз за рахунок збільшення рівня

проапоптичних білків після опромінення. До таких білків відносять: Araf-1 (активуючий фактор апоптичних протеаз I), Бах (білок родини Bcl-2), Noxa. Нещодавно було досліджено, що інгібітор p53 - pifithrin-μ, зменшував вплив опромінення на тромбоцити, та апоптоз клітин [36]. Також було доведено, що підвищення виживання трансгенних мишей після опромінення, що індукує апоптоз в гемопоетичних клітинах, викликає надмірна експресія інгібітора проапоптичних білків Bcl2 [37]. Відомі дані і про те, що сигнальний білок STAT3 (активатор транскрипції) захищає від іонізуючого випромінювання. Він може бути активований за рахунок факторів росту [38]. Еритроїдний фактор 2 відомий як Nrf2 виступає як протизапальний фермент і може регулювати різні транскрипції антиоксидантів і може захищати від негативного впливу іонізуючого випромінювання [39-40]. Також було доведено, що білки теплового шоку відомі, як HSPs також використовуються в якості радіопротекторами, що відновлюють клітини після опромінення. Було доведено, що надмірна експресія тільки лиш одного гену *HSPs* та незначні молекули, що посилюють експресію *HSPs*, буде достатньо для того, щоб набути дію радіопротектора [41-42]. Рецептор-γ, активований проліфератором пероксисом (PPAR-γ) є регулятором активації бробрласту /міобробрласту. Росиглітазон, відомий активатор, що є синтетичним та виступає активатором PPAR-γ, може знижувати пошкодження ДНК та виступати сигналом апоптозу в наслідок опромінення [43]. Отже, специфічні ліганди PPAR-γ можуть використовуватися в якості радіопротекторів та використовуватися при захворюваннях легень [44].

1.5. Класифікація радіопротекторів

На сьогоднішній день існує багато різних класифікацій радіопротекторів. В 1961 році була заснована основна класифікація відомим на весь світ фармакологом Васq. Ним було надану фундаментальне визначення терміну «радіопротектор» – це препарат, введення якого перед

дією іонізуючого випромінювання знижує радіаційний ефект. Але поряд з цим він має ряд обмежень, а саме те, що введення рідопротектора після опромінення є неефективним [45].

За сучасною класифікацією розрізняють такі радіопротектори, відповідно до тривалості дії [46]:

1. Радіопротектори коротко часової дії.
2. Радіопротектори пролонгованої дії.
3. Радіомодулятори, що вважаються стимуляторами радіорезистентності.

Першу групу радіопротекторів короткочасної дії, котрі являються класичними радіопротекторами, відносяться до проекторів І типу.

Радіопротектори короткочасної дії являються класичними радіопротекторами і відносяться до проекторів І типу. Вважають, що це речовини чия дія триває на протязі короткого часу в межах від 30 хвилин до 5 годин [47]. Вони ефективні при дії іонізуючого випромінювання під час первинних радіаційних процесів.

Для радіопротекторів короткочасної дії притаманні такі властивості:

1. для найвищого радіозахисного захисту їх застосування необхідне у високих дозах, а також саме перед початком дії на організм іонізуючим випромінюванням;
2. діють в перші хвилини (можлива дія до декількох годин) з того часу, як речовина надходить у тканини і ця дія триває всього на протязі кількох годин;
3. мають швидкий метаболізм в тканинах і за рахунок цього мають таку короткочасну дію;
4. їх радіопротекторна діє є головною їх фармакологічною характер серед всіх відомих [48].

Радіопротекторів короткочасної дії за своїм застосуванням можна розділити на три основні групи: церебропротектори, ентеропротектори та мієлопротектори [49].

1.5.1. Церебропротектори. Це речовини, що використовуються в діапазоні доз 80 Гр та використовуються для профілактики зазвичай гострої променевої хвороби та від її церебральної форми. До цієї групи відносять металовмісні комплекси. Ці комплекси перешкоджають частковій розтраті макроергів (АТФ і НАДФ), а також знижують основні процеси ліпопероксидації й загибелі нейронів [50].

1.5.2. Ентеропротектори. Це речовини, що використовуються в діапазоні доз 10–20 Гр та використовуються для захисту від так званого специфічного радіаційного ентериту. Жодної чітко затвердженої класифікації та номенклатури радіопротекторів даної групи не існує, але в останній час все більше публікацій та досліджень, що підтверджують їх перспективність у використанні як засоби радіаційного захисту. Відомо, що ця група радіопротекторів має потенційний вплив на стовбурові клітини, серед всіх відомих вони впливають саме на клітин кишкового епітелію. Поряд з цим є дослідження, що підтверджують їх ефективність у підтримці та регуляції проліферативного пулу енероцитів [51].

1.5.3. Мієлопротектори. Це речовини, що використовуються в діапазоні доз 1–10 Гр та використовуються для захисту гемопоетичних тканин. Сірковмісні препарати складають найбільш зустрічаємою групою мієлопротекторів. Ці радіопротектори належать до самих найефективніших і їх показник фактору зменшення дози варіюється від 1,5 до 2,5) [52]. Їх механізм дії досить різноманітний, а саме: відновленню біомолекул, зв'язування двовалентних іонів, інгібування активних біомолекул та інші.

До цієї групи відносяться β -меркаптоетиламін та його цистамін дисульфід, гаммафос, цистафос, аміфостин і ще ряд амінотіолів.

Використання препарату в максимально можливих переносимих дозах дає можливість утворенню прямої залежності між дозою препарату та ступенем вираженості радіопротекторного впливу в тканинах, котрі мають найбільшу враженість іонізуючого випромінювання. Зазвичай необхідне

повторне використання радіопротектора тому, що їх дія короткочасна і складає 3-4 години.

Високу протирадіаційну активність мають і сполуки групи індолілалкіламінів. До них відносять індралін, гексамін та їх антагоністи (наприклад: серотонін, адреналін та інші), а також метгемоглобіноутворювальні сполуки – це такі сполуки, що викликають різного ступеня та характеру порушення транспорту кисню. Механізм дії цих препаратів заснована на тому, що вони спричиняють спазм судин і викликають гіпоксію. [53].

Радіопротектори II типу, що мають ще назву радіопротектори пролонгованої дії – засоби, що ефективні лише при фракційному опроміненні. Ці радіопротектори мають властивість резистентності організму. Їх дія триває до кількох днів. Вони мають такі характеристики:

1. Мають високу ефективність, якщо їх застосовувати за 4-5 доби до опромінення;
2. Найвищий ефект вони мають при незначних дозах опромінення і при їх поступовому збільшенні їх ефект знижується;
3. Радіопротекторний вплив проявляється через декілька годин після опромінення і триває тривалий час.

До групи радіопротекторів пролонгованої дії включаються препарати енерогени (гормональні препарати), котрі мають анаболічні властивості, паліативної природи полімери, гемопоетичні ростові фактори, цистамін(амінокислота з дисульфідними зв'язками) та інші [54]. Механізм їх дії полягає в спричиненні явища гіперестрогенізму, це в подальшому сприяє захисту процесів гемопоезу і покращують виведення радіотоксинів.

РОЗДІЛ II

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали та реагенти, які необхідні для досліджень

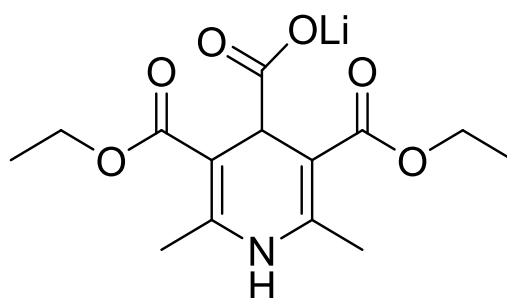
2.1.1. Витратні матеріали. Дослідження були проведені з використанням наступних витратних матеріалів:

1. спиртові серветки;
2. стерильні і нестерильні рукавички;
3. стерильні конічні пробірки (Falcon, 15 мл);
4. пробірки для центрифугування;
5. предметні скельця;
6. стерильні пластикові матраци (NUNC, 25 см²);
7. жовті та сині наконечники для автоматичної піпетки;
8. стерильні 24 та 96-лункові планшети (NUNC).

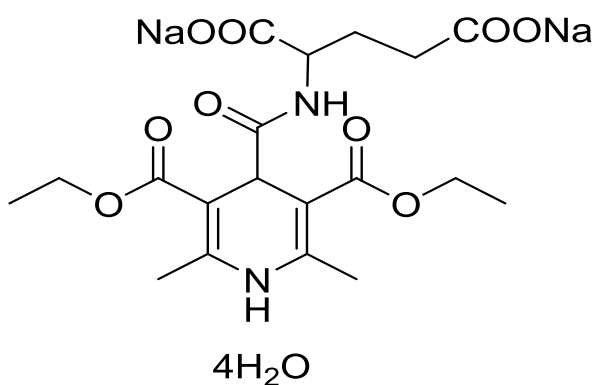
2.1.2. Реактиви. Дослідження були проведені з використанням наступних реактивів:

1. дистильована вода;
2. 70% етиловий спирт (Сановет, Україна);
3. фактор (гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор);
4. середовище для культивування DMEM full (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (комерційна назва Pepro Tech) (Sigma, США);
5. фетальна бичача сироватка (FBS) (Sigma, США);
6. фізіологічний розчин у фосфатному буфері (PBS) (Sigma, США);
7. pen-strep l-glutamine 100x (sigma, США)
8. fungizone (Amphotericin B)100X (Sigma, США)
9. трипсин-ЕДТА 1X (Sigma, США);
10. трипановий синій (Sigma, США);

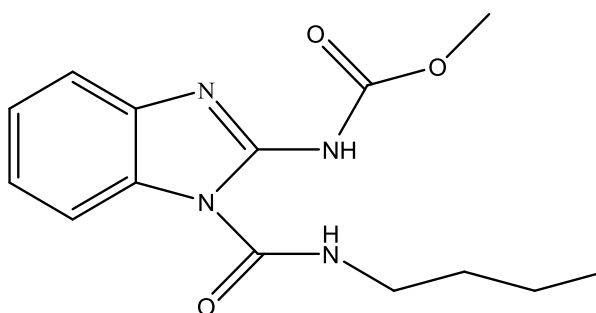
11. сухий 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразолію бромід (MTT) (Sigma, США);
12. ізопропанол (Німеччина)
13. 0,04 М HCl (Сановет, Україна);
14. димексид (ДМСО) (ПАТ «Лубнифарм», Україна)
15. пероксид водню (H_2O_2) (Сановет, Україна);
16. NaCl (Сановет, Україна);
17. Розчини препаратів:
 - AV-153-Li (IOS-1262) (AV-153 Lithium salt).



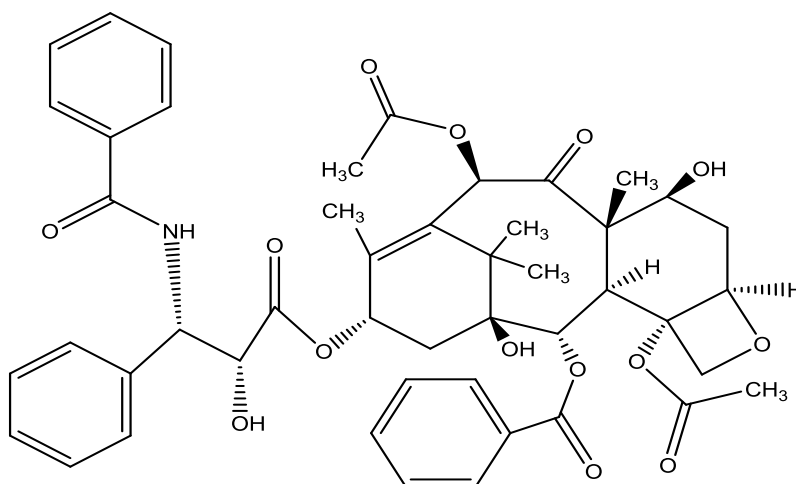
- Glutapirone (Володіє радіопротекторною активністю системної дії. Антимутаген. $\text{LD}_{50} > 2000$ мг/кг (в/в). Антиаритмічний препарат, який мало впливає на артеріальний тиск та має нейротропну дію.



- Benomyl K (+) (100 mM)



– Paclitaxel T-7402 (100 mM)



2.1.3. Лабораторний посуд. Дослідження були проведені з використанням наступного лабораторного посуду:

1. скляні банки з кришками для розчинів;
2. скляні пробірки з гумовими корками;
3. пеніцилінки;
4. пробірки Falcon 50 мл, стерильні;
5. конічні мікропробірки Eppendorf, стерильні;
6. автоматичні дозатори на 10-100 та 100-1000 мкл (Gilson, Велика Британія);
7. пластикові наконечники для автоматичних дозаторів на 10-100 та 100-1000 мкл (Gilson, Велика Британія);
8. скельця для мазків;
9. скляні стаканчики;
10. пластикові 24-лункові планшети NUNC, стерильні;
11. пластикові 96-лункові планшети NUNC;
12. пластикові матраси NUNC, стерильні.

2.1.4. Обладнання. Дослідження були проведені з використанням наступного обладнання:

1. ламінарний бокс (AIRFLOW, США);
2. CO₂ інкубатор (LEEC, Велика Британія)

3. аналітичні ваги (Cytogenex);
4. центрифуга (Jouan M 14.11; Labofuge 200, Sepatech, Германия);
5. морозильна камера;
6. холодильна камера;
7. мікроскопи (інвертований (Olympus, США), трансмісійний (Leica DMDL));
8. УФ- лампа;
9. камера Горяєва (МиниМед, Росія);
10. портативний комп'ютер;
11. фотоколориметр (Dynatech MR 4000);
12. фільтри з довжинами хвиль: 410 nm і 630 nm;
13. центрифуга (Jouan M 14.11; Labofuge 200, Sepatech, Німеччина);
14. принтер (Epson LX – 400).

2.2. Підготовка до експерименту

2.2.1. Обробка боксу. Обробка боксу проводилася в такій послідовності:

1. промили 3% розчином перекисю водню;
2. промили 70% спиртом;
3. миємо поли зі стерилізуючим розчином;
4. включаємо УФ- лампи в боксі і ламінарній шафі на 30 хв.(допускається більше 30 хв., але не менше).
5. виключаємо лампи і чекаємо 30 хв.

2.2.2. Автоклавування лабораторного посуду. Для дослідження проводили автоклавування такого посуду:

1. пеніцилінки (закриті фольгою, приблизно 4 пеніцилінки на 1 пацієнта).
2. пробірки і пробки (гумові). Ставимо на автоклавування окремо(приблизно 5 пробірок на 1 пацієнта).

3. носики на сэмплери.

2.3. Схема експерименту та об'єкт дослідження

Клітинна лінія MCF-7 – це культура клітин, що має людське походження. Данана лінія була отримана з плевральної рідини жінки, котра була хворою на аденокарциному молочної залози. Культура MCF-7 належить до таких, що мають необмежений термін життя і називається трансформованою.

Дану клітинну лінію використовують для дослідження багатьох явищ: канцерогенезу, клітинного диференціювання, внутрішньоклітинних сигнальних процесів, фармакодинаміки, клонування, для визначення протипухлинного ефекту та цитотоксичності різноманітних речовин, у клітинній біології тощо.

Дану клітинну лінію було люб'язно надано співробітниками Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Проведено суспензійне культивування в рідкому живильному середовищі DMEM з додаванням 10% фетальної телячої сироватки (FBS), 2 мМ L-глутаміну та таких кількостей протимікробних препаратів: амфотерицину В – 2,5 од/мл, пеніциліну – 100 од/мл, стрептоміцину – 100 мкг/мл. Оптимальна щільність культури складала $1 \cdot 10^4$ клітин/см². Завдяки здатності до швидкої проліферації клітинна лінія MCF-7 дозволяє отримувати достатню кількість дослідного матеріалу за умов 5% CO₂, температури 37°C та відносно короткий проміжок часу [55].

Було накопичено біомасу клітин MCF-7 у достатній якості та кількості для проведення подальших експериментів. Отримані суспензії клітин характеризувалися високими концентраціями (близько $1 \cdot 10^6$ кл/мл) та показниками виживаності (90-97%). Морфологічна оцінка культур на етапі культивування у матрасах показала, що лінія є однорідною, а її морфологічні ознаки відповідають характеристикам лінії MCF-7.

2.4. Методи оцінки життєздатності клітин в культурі

Клітинні відповіді оцінювали у різні терміни культивування клітин за загальноприйнятими показниками життєздатності: проліферативна і мітотична активність та кількість гігантських багатоядерних клітин [55]. Проліферативну активність клітин оцінювали за кінетикою росту. Для цього клітини у кількості 5×10^4 в 1 мл живильного середовища вносили у пляшечки для культивування, на дні яких знаходились покривні скельця розмірами 16×8 мм. Упродовж п'яти діб, щоденно, готували препарати: фіксували 96° етанолом та забарвлювали гематоксилін-еозином. На предметне скло препарати з забарвленими клітинами наклеювали канадським бальзамом. Під оптичним мікроскопом «Axioscop» (West Germany) при збільшенні у 400 і 1000 разів у межах сітки площею, $0,05 \text{ мм}^2$, методом випадкових полів за С. Б. Стефановим підраховували загальну кількість клітин, кількість мітозів і кількість гігантських багатоядерних (2 і більше ядер) клітин. Мітотичний індекс та індекс гігантських багатоядерних клітин розраховувався на 1000 клітин (%). Фото отримані за допомогою цифрової камери DIGITAL CAMERA for Microscope Science Lab DCM320 (USB 2.0) Resolution 3.5 Mpixels.

2.5. Отримання біомаси та стандартизація концентрації клітин MCF-7

Клітини для дослідження вирощували на середовищі DMEM з додаванням 10% FBS (фетальної телячої сироватки) на пластикових матрацах в об'ємі 5 мл. Для зняття моношару клітин з поверхні матрасів зливали культуральну рідину, промивали 2-ма мл PBS і вносили 2 мл 1X розчину трипсину-ЕДТА. Після п'ятихвилинної інкубації за 5% CO₂ і температури 37°C проводили контроль відкріплення клітин від поверхні під інвертованим мікроскопом. Суспензію клітин у розчині трипсину-ЕДТА переносили в

конічні пробірки (по 15 мл), центрифугували 5 хв при 270 g, зливали надосадову рідину та ресуспендували у 3 мл PBS із метою видалення залишків трипсину. Повторювали центрифугування і ресуспендували клітини у 2 мл середовища DMEM. Для підготовки клітин до експерименту проводили підрахунок клітин і встановлювали відсоток їх виживаності [55].

Для підрахунку клітин та визначення відсотку виживаності відбирали 5 мкл із загальної клітинної суспензії, змішували з 5 мкл трипанового синього і вносили у камеру Горяєва в об'ємі 5 мкл. Підраховували загальну кількість клітин (безбарвних та забарвлених трипановим синім) та кількість живих (безбарвних) клітин у 5 великих квадратах по діагоналі. Співвідношення кількості живих клітин до загальної кількості, помножене на 100%, є відсотком виживаності клітин. Біомаса вважалась придатною для використання в експерименті, якщо виживаність становила більше 70%.

Стандартизація концентрації клітин для культивування у 24-лункових культуральних планшетах відбувалась за такою формулою:

$$1) \quad (n \cdot 5 \cdot 1000) / 50000 = \text{ф.р.}$$

$$2) \quad 1000 / \text{ф.р.} = x$$

$$3) \quad 1000 - x = y$$

де n - кількість живих клітин, $5 \cdot 1000$ – розрахунок концентрації на 1 мл, 50000 – очікувана концентрація в лунці 24-лункового планшета, ф.р. - фактор розведення, x – об'єм суспензії клітин, що необхідно внести в кожну лунку, y - об'єм середовища, що необхідно внести в кожну лунку.

2.6. Підготовка робочих розчинів

Концентрований розчин МТТ (20 мг/мл) підготовлювали шляхом розчинення 35 мг сухої речовини МТТ у 1,75 мл етилового спирту. Концентрація робочого розчину становила 5 мг/мл, що досягалась шляхом розчиненням концентрату у PBS у співвідношенні 1:3.

Концентровані розчини дослідних препаратів підготовлювали шляхом розчинення сухих речовин у ДМСО, як вказано у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Підготовка концентрованих розчинів препаратів похідних 1,4
дигідропіридину

№	Препарат (назва)	Молекулярна маса (Mr), г/моль	Загальна маса (m), г	Об'єм ДМСО (V), мл	Концентрація препарату (с), мМ
1	Glutapirone	542,45	1,1	0,92	100
2	AV-153-Li (IOS-1262)	303,24	0,35	1,6	100
3	Benomyl K (+)*	290,32	0,092	3169	100
4	Paclitaxel (T- 7402)*	853,906	0,006	70,3	100

* - Негативний контроль

Для підготовки робочих розчинів маточні розчини розводили у 10 разів (до концентрації 10 мМ) сумішшю ДМСО:PBS у співвідношенні 1:1 у стерильних умовах, і отримані розчини використовували для підготовки розчинів 55, 275, 1100, 2750 та 5500 мкМ за схемою, наведеною у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Підготування робочих розчинів досліджуваних препаратів похідних 1,4
дигідропіридину

Концентрація робочого розчину, мкМ	Об'єм 10-мМ розчину, мкл	Об'єм суміші ДМСО:PBS, мкл
55	2, 75	497,5
275	13,6	486,4
1100	55	445
2750	139	361
5500	276	224

Отримана серія розчинів досліджуваних сполук надалі використовувалася на всіх етапах роботи. Під час їх підготовки керувалися принципом серійного розведення: різні кількості концентрованого розчину додавали до відповідних об'ємів розчинника. Перевага такого підходу полягає в тому, що до клітин у культуральних планшетах буде вноситись однаковий об'єм розчинів з різними концентраціями. На відміну від попередньої схеми, яка полягала у додаванні до клітин різного об'єму робочих розчинів з концентраціями 400 та 1000 мкМ, дана схема виключає можливий вплив розчинника на проліферацію клітин (відомо, що ДМСО дещо стимулює ріст клітин у культурі за малих концентрацій, а великі його дози є токсичними [56]), оскільки кожна лунка отримує однакову дозу. Водночас є можливість оцінити дозозалежний вплив нових похідних препарату 1,4 дигідропіриліну: якщо додавати до культур клітин у лунках об'ємом 1,1 мл вищезазначені робочі розчини в об'ємі 20 мкл, то кінцеві концентрації становитимуть 1, 5, 20, 50 та 100 мкМ. Окрім того, проста схема внесення препаратів забезпечує точність виконання, мінімізує похибки та економить час.

2.7. Проведення МТТ-тесту

На першу добу в 24-лункові планшети вносили поживне середовище DMEM та суспензію клітин MCF-7 загальним об'ємом 1000 мкл. Концентрація клітин в кожній з лунок становила 4×10^4 . Після інокуляції відбувалася візуальна перевірка клітин під мікроскопом на наявність, чистоту та візуальну однорідність концентрацій клітин. Підписані та пронумеровані планшети поміщали в CO₂ інкубатор на 24 години.

На другу добу проводили візуальний контроль культур під інвертованим мікроскопом; лунка планшету вважалася придатною до використання в експерименті, якщо вона містила щонайменше 80% адгезованих клітин, що є ознакою їх здатності до проліферації. Додавали по 100 мкл фетальної телячої

сироватки в кожен лунку. Створювали план-схему додавання препаратів. Відповідно до схеми вносили препарати у планшети. Кожну сполуку тестували у концентраціях 1, 5, 20, 50 та 100 мкМ, які досягалися шляхом внесення 20 мкл робочих розчинів з концентраціями 55, 275, 1100, 2750 та 5500 мкМ відповідно. Кожну концентрацію тестували у трьох повторах. Ще до трьох лунок додавали по 20 мкл суміші ДМСО з PBS у співвідношенні 1:1 для оцінки впливу розчинника на життєздатність клітин. Щонайменше три лунки з інтактними клітинами використовували в якості негативного контролю.

На третю добу переглядали планшети під мікроскопом з метою візуальної оцінки цитотоксичних ефектів. У випадку утворення осаду будь-якої з досліджуваних сполук відмічали мінімальну концентрацію, на якій з'являвся осад, та його кількість. Результати заносили у таблицю. Перед початком роботи готували робочий розчин МТТ (5 мг/мл). В кожен лунку планшету додавали по 10 мкл розчину. Після додавання МТТ загальний вміст лунок перемішували автоматичними піпетками та коловими рухами планшетів протягом 5 хв. Інкубували в CO₂ інкубаторі протягом 2 год 30 хв. Розчин МТТ є чутливим до дії світла, тому всі види роботи з даним розчином проводили в ламінарному боксі з вимкненим світлом [56].

Після інкубації перевіряли наявність кристалів формазану під інвертованим мікроскопом. Далі вміст кожної з лунок переносили у нестерильних умовах у завчасно приготовані та підписані конічні мікропробірки Eppendorf. Центрифугували 5 хв при 2160 g. Автоматичними піпетками відбирали надосадову рідину. Осад, що є кристалами формазану, розчиняли в 100 мкл ізопропанолу з 0,04 М HCl. Ресуспендували автоматичними піпетками, а потім центрифугували 5 хв при 2160 g, аби відокремити клітинні рештки.

Створювали план-схему розташування зразків у 96-лунковому планшеті. Відповідно до схеми переносили надосадову рідину кожної з пробірок в об'ємі 100 мкл. Аналіз на цитотоксичність та антипроліферативні властивості

препаратів проводили на спектрофотометрі при довжинах хвиль: 410 нм, 630 нм та 410/630 нм. Результати визначалися як одиниці абсорбції.

Отримані дані перераховували у відсотки життєздатних клітин, після чого перевіряли вибірки на нормальність розподілу методом Шапіро-Уїлка. Оскільки всі групи даних підкорялись закону нормального розподілу, всі розрахунки з визначення статистичної достовірності проводили за допомогою критерію Ст'юдента з виправленням Бонферроні (рівень значущості $p \leq 0,05$). Обробку даних здійснювали у програмі Microsoft Excel 2010.

2.8. Отримання ДНК-комет та аналіз даних

Метод ДНК-комет – це, по суті, електрофорез ДНК на рівні однієї клітини. Він отримав свою назву за характерною формою «хвоста» ДНК, що видно позаду клітинного ядра під флуоресцентним мікроскопом після фарбування препаратів ДНК-тропним барвником [57-58]. Цей метод дозволяє оцінити вплив досліджуваного фактору на структуру ДНК, а саме появу двониткових розривів у ДНК будь-яких клітин (бактеріальних, дріжджових, тваринних тощо). Після того, як клітини, оброблені досліджуваною речовиною, поміщають на предметне скельце в агарозному гелі та лізують клітинні мембрани, проводять електрофорез, під час якого пошкоджена ДНК виходить за межі ядра та утвореної клітиною агарозної «комірки» [59]. Чим більше утворилося двониткових розривів, тим а) вміст ДНК у хвості комети буде вищий; б) тим хвіст буде довший.

Перед постановкою експерименту готували наступні розчини:

1. Розчин для знежирення скелець: $V(\text{H}_2\text{O}) = 5$ мл, $V(\text{H}_2\text{O}_2) = 3$ мл, $V(\text{HCl}) = 3$ мл.
2. Лізуючий розчин: $V = 500$ мл, $\text{pH} = 10$, $[\text{NaCl}] = 2,5\text{M}$, $[\text{Tris-HCl}] = 10$ мМ $[\text{triton X100}] = 5$ мкл, $[\text{EDTA}] = 100\text{mM}$
3. Нейтралізуючий розчин: $V = 500$ мл, $[\text{Tris-HCl}] = 0.4$ М

4. агарозний гель: $V = 70$ мл, [агарози] = 0,7%
5. ТАЕ-буфер (трис-ацетат-ЕДТА): $V = 2000$ мл, [Tris] = 40 mM, [acetate] = 20 mM, [ЕДТА] = 1 mM.
6. Барвник: бромистий етидій та ТАЕх1, як 1:25

Підготовку біомаси клітин MCF-7 до експерименту та внесення препаратів проводили, як описано у розділі 2.5. Після добової інкубації клітин з препаратами, безпосередньо перед початком роботи, чисті скельця обробляли розчином для знежирення, промивали дистильованою водою та висушували. На матовані частини скелець тонким шаром наносили розплавлений агарозний гель і підсушували.

Далі вносили по 250 мкл агарозного гелю в мікропробірки, які вміщували у термоблок, заздалегідь підігрітий до 45°C. У кожную пробірку додавали по 100 мкл суспензії клітин, оброблених тим чи іншим препаратом. Після перемішування наносили по 100 мкл суспензії на скло, покрите шаром агарози, і клали покривне скельце, щоб вирівняти поверхню гелю. Предметні скельця з клітинами поміщали на 2 хв. на танучий лід, після чого знімали покривне скельце та занурювали зразки у ємність з лізуючим розчином. Через 10 хв зливали лізуючий розчин і додавали нейтралізуючий розчин на 30 хв. Після цього заповнювали електрофоретичну ємність 1x ТАЕ буфером та проводили електрофорез впродовж 25 хвилин за напруги 7 В/см.

Після електрофорезу скельця фарбували бромистим етидієм та оцінювали результат за допомогою флуоресцентного мікроскопа та зеленого фільтру. Кожну ДНК-комету фотографували та аналізували за допомогою програми Image J (Plugin Open Comet 1.3). Дана програма дозволяє в автоматичному режимі відділити нормальні комети від продуктів злиття кількох комет, неправильно сформованих комет та інших об'єктів, що можуть бути присутні на фотографії (рис. 2.1). Для нормальних комет обраховуються такі показники, як розмір комети, розмір та довжина хвоста, інтенсивність хвоста та відсотковий вміст ДНК у хвості [59].

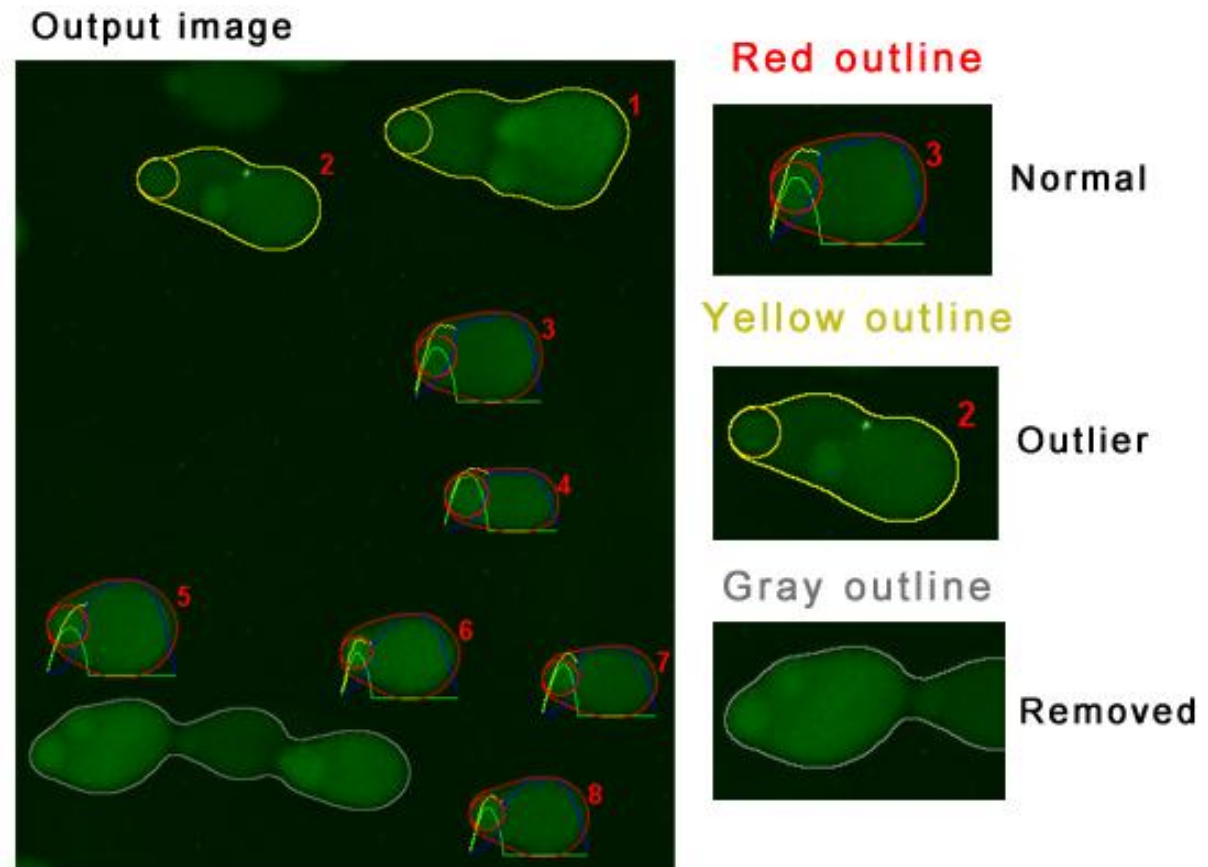


Рис. 2.1. Приклад автоматичного розпізнавання нормальних ДНК-комет (Normal), неправильно ідентифікованих комет (Outlier) та сторонніх об'єктів (Removed) у плагіні OpenComet [59].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка дозозалежного цитотоксичного ефекту препаратів похідних 1,4-дигідропіридину на культуру клітин MCF-7

3.1.1. Оцінка осадоутворення. Одним з самих важливих показників для будь-якого фармацевтичного препарату є його здатність розчинятися у різноманітних розчинниках. Досліджувані препарати похідних 1,4-дигідропіридину повинні добре розчинними в культуральному середовищі, а саме в полярному середовищі. Це необхідно для того, щоб в майбутньому вони проявляли передбачену комп'ютерним скринінгом антимітотичну активність. Результати візуальної оцінки осадоутворення культури клітин MCF-7 під інвертованим мікроскопом через 24 години після внесення препаратів наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1.

Утворення осаду досліджуваних препаратів похідних 1,4-дигідропіридину та контрольних препаратів у лунках культурального планшету на третю добу експерименту

Препарат	Інтенсивність осаду за концентрації, мкМ				
	1	5	20	50	100
Glutapirone	-	-	-	+	+
AV-153-Li (IOS-1262)	-	-	-	+	+
Benomyl K (+)**	-	-	-	-	-
Paclitaxel (T-7402)**	+	+	++	+++	+++

Примітка. «-» - Осад відсутній, «+» - незначна кількість осаду в деяких лунках планшету, «++» - помірна кількість осаду в усіх лунках, «+++» - значна кількість осаду.

Отже, досліджуваний препарати добре розчинний у водному середовищі, що свідчить про адекватний підбір розчинника та гідрофільні властивості препарату Glutapirone.

3.1.2. Цитотоксичний вплив розчинника і контрольних препаратів.

З метою порівняння цитотоксичних ефектів досліджуваних препаратів похідних 1-4 дигідропіридину було взято в якості позитивного контролю препарати Беноміл і Паклітаксел. В якості негативного контролю використовували розчинник, що застосовувався для усіх препаратів, тобто суміш диметилсульфоксиду (DMSO) з PBS у співвідношенні 1:1. Було виявлено, що як Беноміл, так і Паклітаксел володіють значним цитотоксичним ефектом, що ілюстративно позначено на рис. 3.1. Дані показують, що виживаність клітин лінії MCF-7 під дією розчинника становить майже 96% і це свідчить про те, що розчинник має незначний вплив на результати досліджень. А вплив контрольних препаратів, починаючи з найменшої концентрації, знижують життєздатність клітин приблизно на 15-20%.

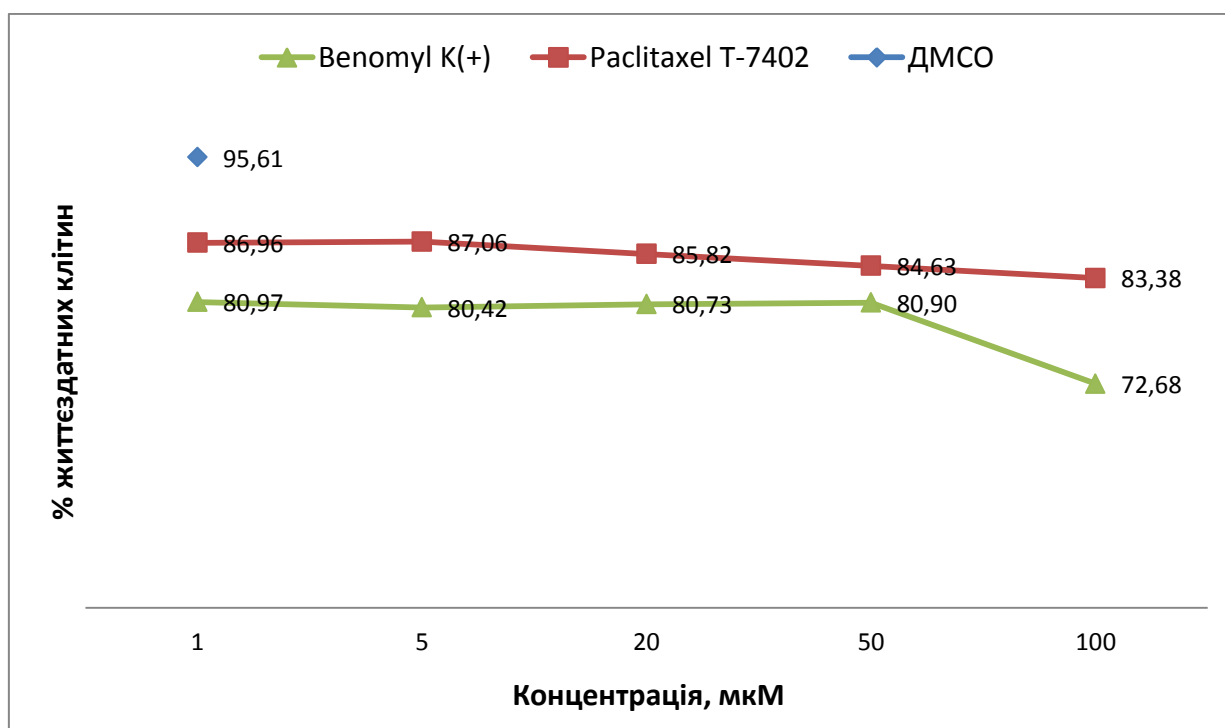


Рис. 3.1. Вплив Паклітакселу та Беномілу на життєздатність клітин MCF-7 в залежності від дози препаратів.

Так, у концентрації 1 і 5 мкМ цитотоксичність беномілу та палітокселу була незначною. При концентрації 10 і 20 мкМ препарати впливають на кількість живих і метвих клітин. Під дією беномілу кількість живих клітин зменшувалася до 80%, а палітокселу до 85%. При концентрації 100 мкМ можна спостерігати більш значну відмінність в дії препарату на клітини, так беноміл на 11% ефективніший за паклітаксел. Також спостерігалася відмінність в утворенні осаду, паклітаксел, починаючи з 1 мкМ, утворював осад у культуральному середовищі, беноміл залишався повністю розчинним у всьому діапазоні концентрацій. Можливо, цим можна пояснити, що активність паклітакселу нижча у порівнянні з беномілом.

3.1.3. Цитотоксичний вплив досліджуваних препаратів похідних 1,4 дигідропіридину. Препарат Glutapirone не виявляє цитотоксичну активність, що видно з рисунка 3.2. Показано, що при концентрації 20 мкМ його ефект не відрізняється від контрольних препаратів паклітакселу та беномілу на рівні значущості $p \leq 0,05$ становить 88%. Але дана концентрація зазвичай не входить до терапевтичного діапазону. При концентрації 50 та 100 мкМ цитотоксична активність є незначною, це можна пояснити тим, що речовина утворювала осад при цих концентраціях. Отже, цю речовину можна використовувати у подальшій розробці радіопротекторних препаратів.

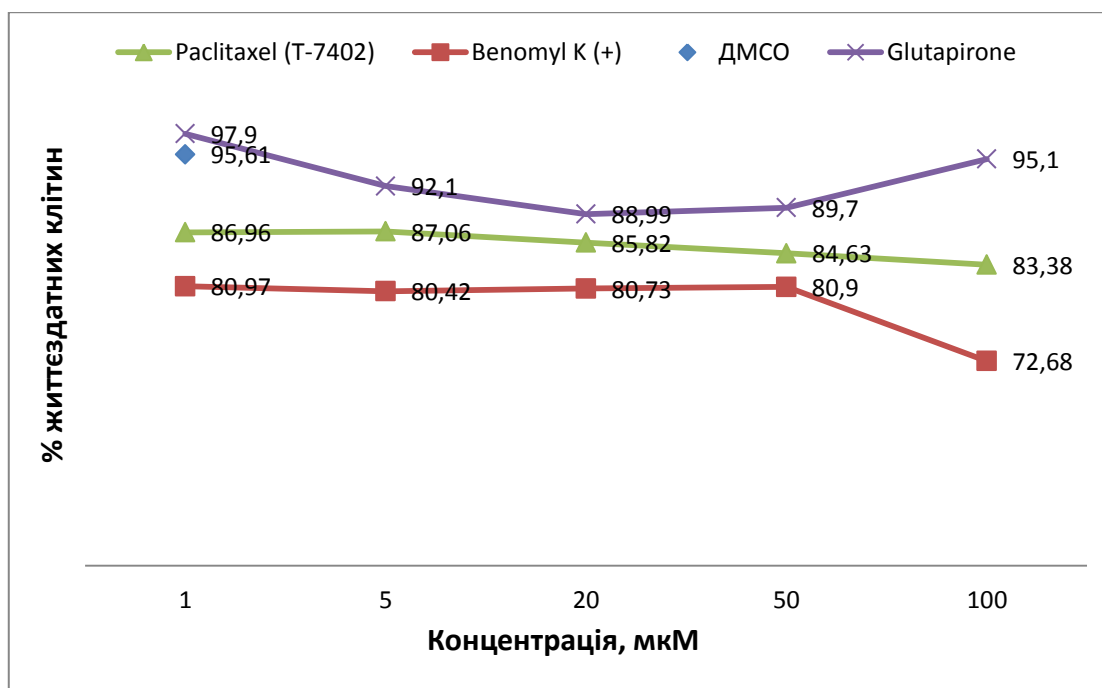


Рис. 3.2. Вплив препарату Glutapirone на життєздатність клітин MCF-7 у порівнянні з Паклітакселом та Беномілом.

Препарат AV-153-Li (IOS-1262) так які попередній не виявляє цитотоксичної активності, що видно з рисунка 3.3. Показано, що при концентрації 20 мкМ його ефект не відрізняється від контрольних препаратів беномілу та паклітаксел на рівні значущості $p \leq 0,05$ становить 86%. Але дана концентрація зазвичай не входить до терапевтичного діапазону. Так як і в попередньому випадку при концентрації 50 та 100 мкМ цитотоксична активність даного препарату досить незначна, це можна пояснити тим, що речовина утворювала осад при цих концентраціях. Отже, цю речовину можна використовувати у подальшій розробці радіпротекторних препаратів.

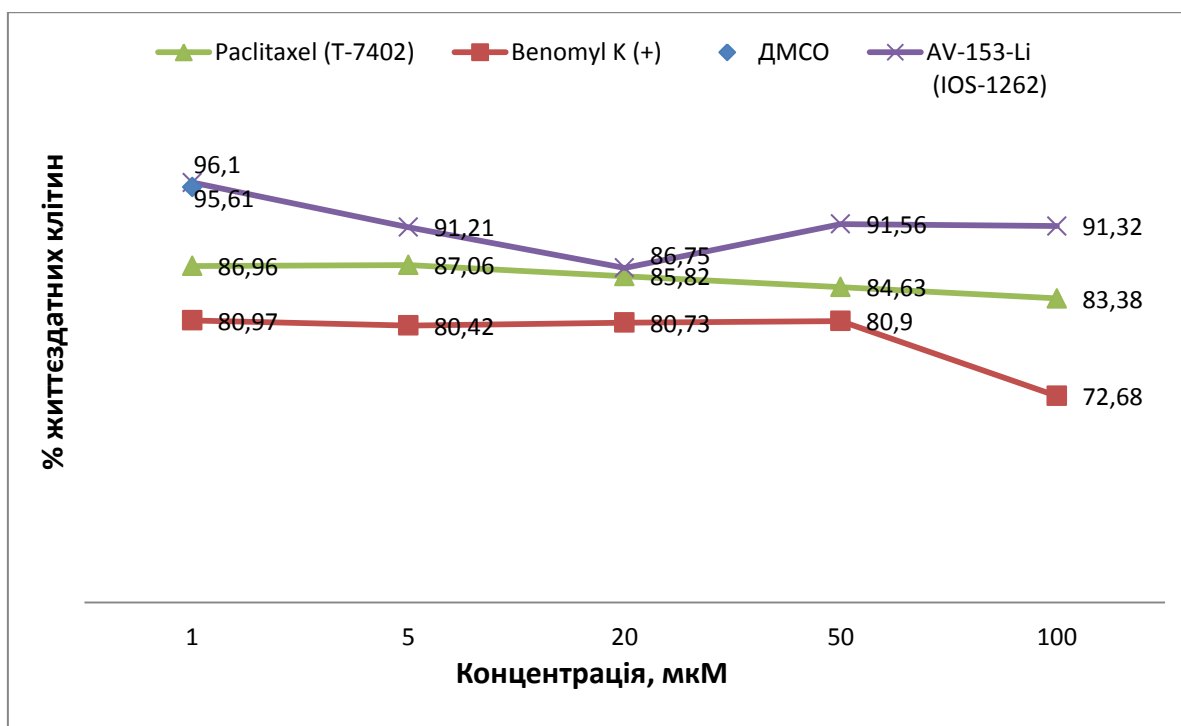


Рис. 3.3. Вплив препарату AV-153-Li (IOS-1262) на життєздатність клітин MCF-7 у порівнянні з паклітакселом та беномілом.

Препарат Glutapirone має нищу цитотоксичну активність в порівнянні з AV-153-Li (IOS-1262). Так, при концентрації 20 мкМ цитотоксичний ефект Glutapirone становить 88%, а AV-153-Li (IOS-1262) 86%. Отже, ці два препарати можна в подальшому використовувати у розробці нетоксичних радіопротекторних препаратів.

3.2. Морфофункціональні показники життєздатності клітин лінії MCF-7 в нормі

Клітини MCF-7 у процесі росту утворили щільний шар на поверхні курторального середовища і є адгезивно залежні. В продовж перших днів культивування нами було виявлено кластери і колонії, що в подальшому утворювали майже суцільний моношар, а інколи спостерігали скупчення клітин у кількох шарах. Зазвичай клітини MCF-7 мають веретеноподібну або неправильну форму і короткі відростки. Під інвертованим мікроскопом часто

ідентифікувалися округлі ядра з ядерцями. Клітини, що вступали в поділ або апоптоз, набували округлої форми. Відмерлі клітинні рештки відкріплялися від пластику і знаходились в товщі живильного середовища (рис. 3.4).

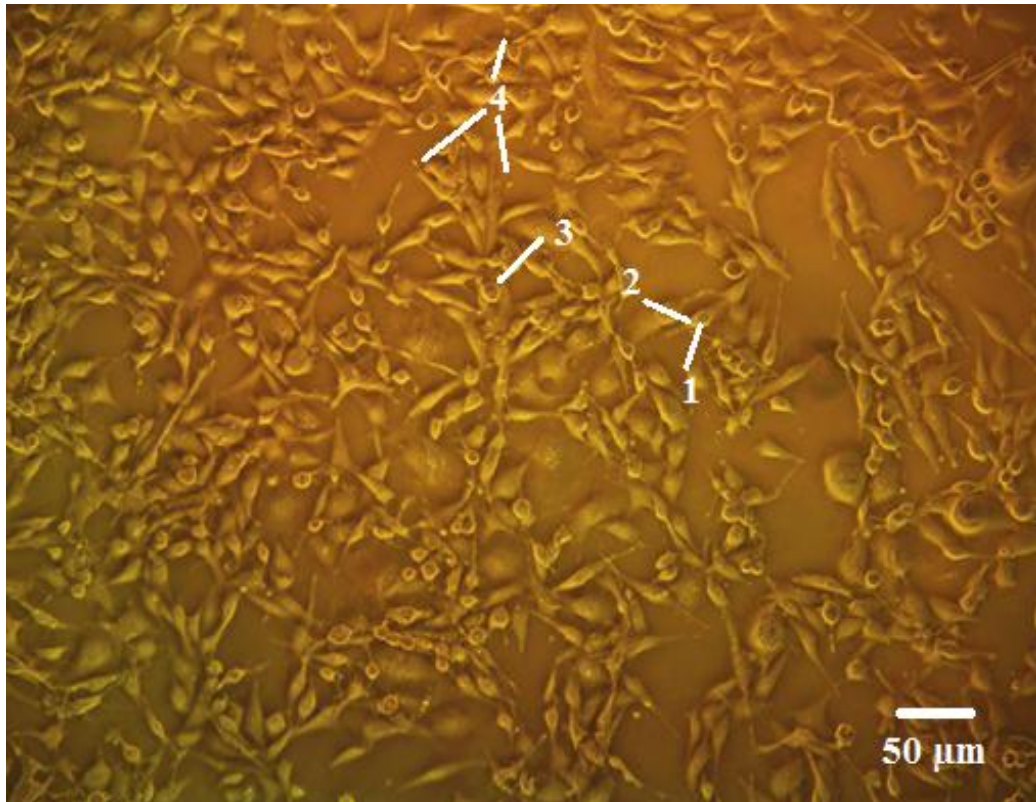


Рис. 3.4. Мікрофотографія культури клітин аденокарциноми молочної залози MCF-7 на 72-гу годину культивування. 1 - ядро з ядерцями, 2 - цитоплазма, 3 - клітина в мітозі, 4 – апоптичні тільця.

Дослідження кінетики росту культури клітин MCF-7 в контролі показало, що для них характерне збільшення проліферативної активності протягом 1–4 діб культивування (фаза логарифмічного росту) з поступовим виходом на плато на 5–6-ту добу (фаза стаціонарного росту).

У ці терміни щільність моношару клітин досить висока. Максимум мітотичної активності спостерігався на 4-ту добу культивування. У подальшому мітотичний індекс зменшувався за рахунок контактного інгібування мітозу та конfluентного стану культури клітин. Індекс гігантських полікаріоцитів в інтактному контролі становив 9 – 24 % (рис. 3.5.).

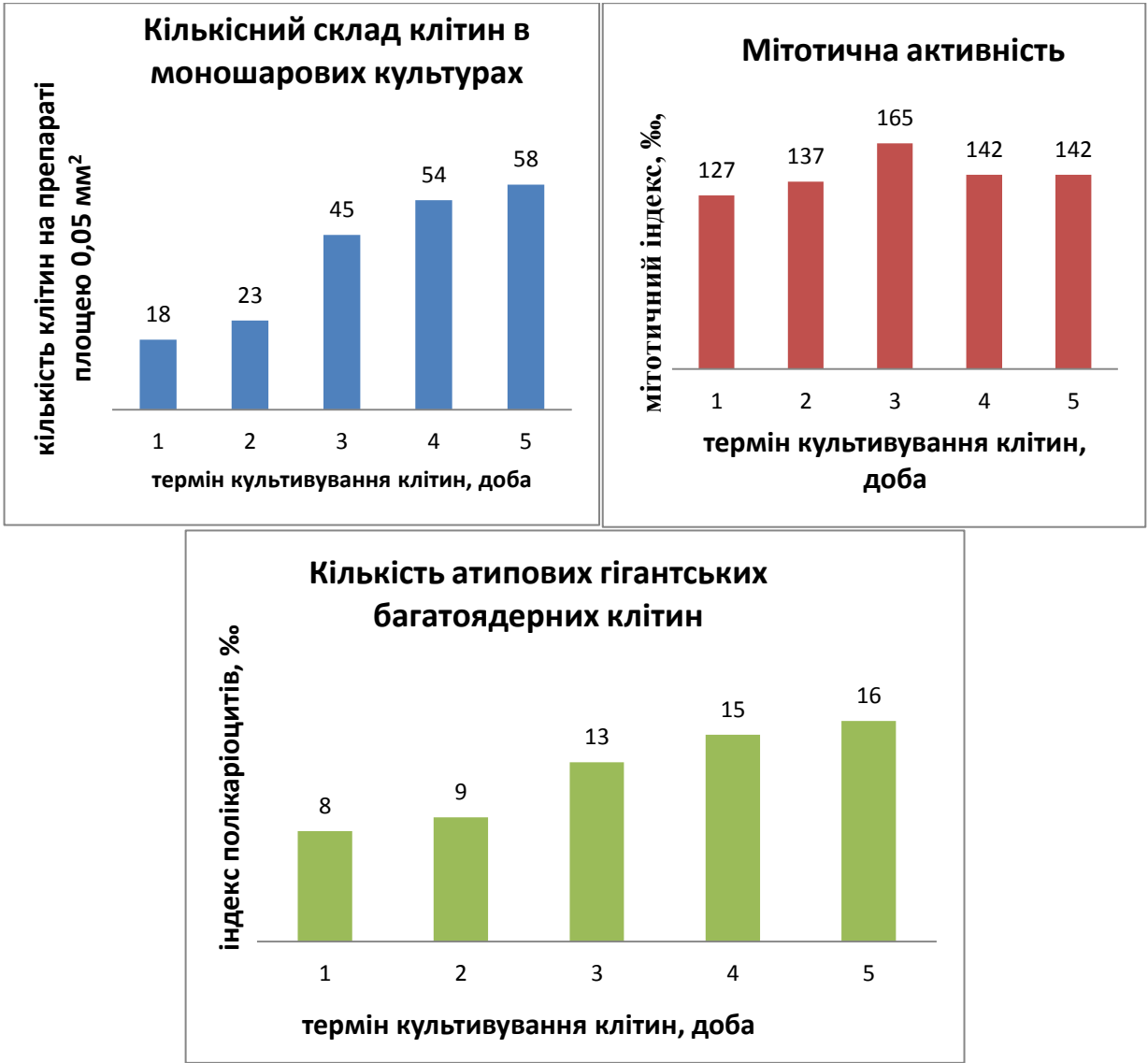


Рис. 3.5. Кінетика показників життєздатності клітин лінії MCF-7 в процесі культивування (5 діб).

Таким чином, культура клітин лінії MCF-7 завдяки доступності, легкості у культивуванні та відтворюваності результатів може бути адекватною моделлю для експериментальних досліджень показників її життєздатності при дії на неї чинників різної природи.

3.3. Морфофункціональні показники життєздатності клітин лінії MCF-7 під впливом препаратів похідних 1,4-дигідропіридину

Дослідження морфофункціональних властивостей клітин лінії MCF-7 (проліферативна та мітотична активність, гетерогенність за морфологічним складом) в умовах впливу препаратів похідних 1,4-дигідропіридину показало, що під їх вплив не призвів до зменшення щільності клітинної популяції, тобто проліферативна активність клітин не зменшилася. Отже, не спостерігалось втрати клітинами здатності до необмеженого росту і це свідчить про те, що препарати похідних 1,4-дигідропіридину не мають цитотоксичного впливу. Для них так як і для контролю притаманне збільшення проліферативної активності на 1-4 діб культивування. Так як і для контролю, під час цього періоду, спостерігається досить висока щільність моношару клітин MCF-7 (рис. 3.7.). Окрім того, що препарати не змінювали щільність клітинної популяції, мітотичний індекс культивованих клітин не падав і на 4-ту добу культивування було спостережено максимум мітотичної активності, для Glutapirone – 53%, а для AV-153-Li (IOS-1262) – 52% (рис. 3.8.). Індекс гігантських полікаріоцитів майже не відрізняється від контролю і становив 17 % для Glutapirone та 19% для AV-153-Li (IOS-1262) (рис. 3.9.). Спостерігалися клітини переважно веретеноподібної форми з короткими відростками. На препаратах виявлялися незначна кількість атипіваних клітин округлої форми. Гетерогенність культури не була збільшена. Отже, дія препаратів похідних 1,4-дигідропіридину, а саме Glutapirone та AV-153-Li (IOS-1262) не призвела до суттєвої зміни морфофункціональних властивостей клітин лінії MCF-7.

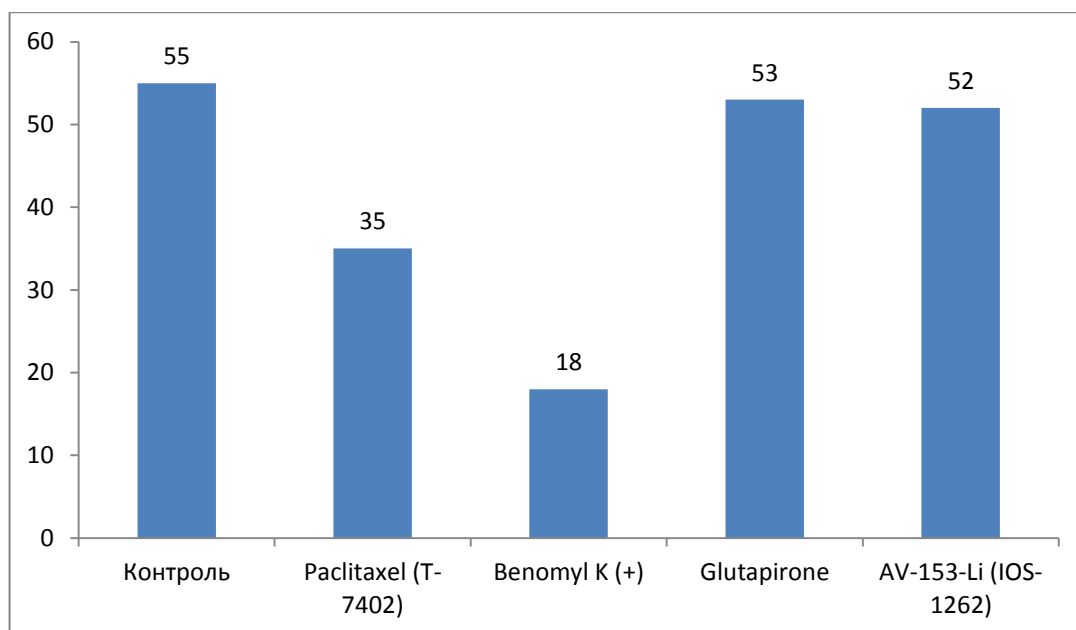


Рис.3.6. Вплив препаратів похідних 1,4-дигідропіридину на кількість клітин в культурі MCF-7 на 5-ту добу (доза 100мкМ).

Примітка: вірогідність щодо контролю і між групами ($p < 0,05$).

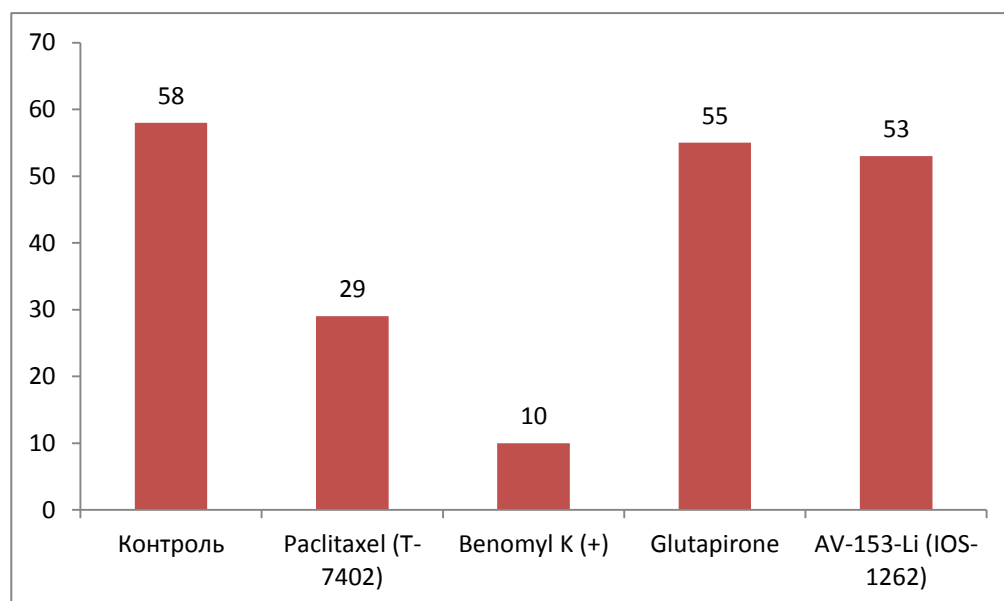


Рис. 3.7. Мітотичний індекс культивованих клітин під впливом препаратів похідних 1,4-дигідропіридину на 5-ту добу (доза 100мкМ).

Примітка: вірогідність щодо контролю і між групами ($p < 0,05$).

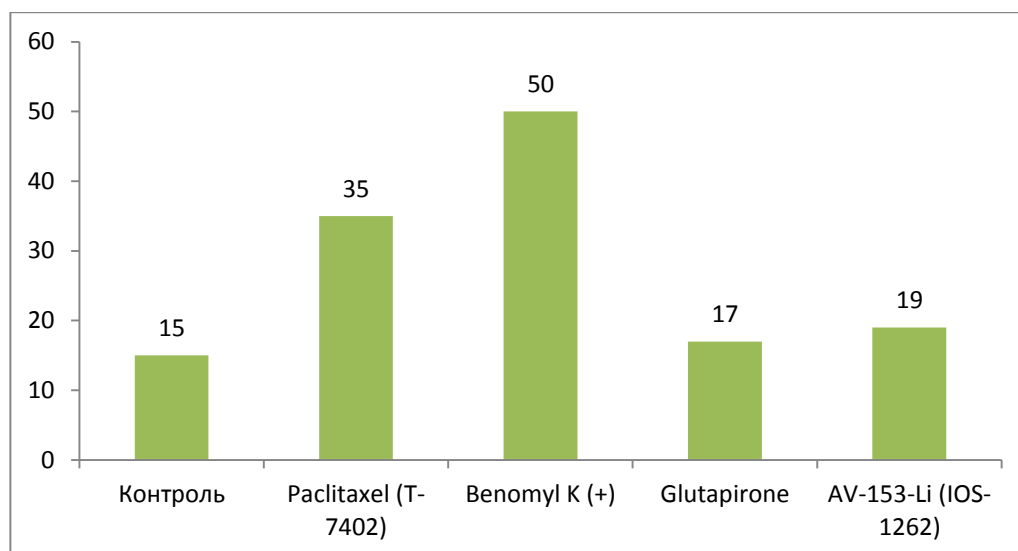


Рис. 3.8. Індекс полікаріоцитів культивованих клітин під впливом препаратів похідних 1,4-дигідропіридину на 5-ту добу (доза 100 мкМ).

Примітка: вірогідність щодо контролю і між групами ($p < 0,05$).

3.4. Визначення цитотоксичного впливу контрольних препаратів на ДНК клітин лінії MCF7 за допомогою методу ДНК-комет

Беномил і паклітаксел використовували у тесті для визначення можливих пошкоджень ДНК.

За допомогою програми ImageJ (плагін OpenComet) визначили розміри комет, довжину їх хвостів, а також вміст у них ДНК. Далі комети розподіляли по класах від I до V за цими двома показниками і розраховували відповідні індекси за такою формулою:

$$I = ((0 \cdot n_I) + (1 \cdot n_{II}) + (2 \cdot n_{III}) + (3 \cdot n_{IV}) + (4 \cdot n_V)) / \sum n,$$

де n – це кількість комет у відповідному класі.

Ця формула дозволяє отримати кількісний показник, який відображає відносні кількості комет з вищими та нижчими значеннями параметрів (довжина хвоста, вміст ДНК у хвості). Індекс збільшується із збільшенням кількості комет у вищих класах, тобто таких, які об'єднують комети з

найдовшими хвостами на найвищим вмістом ДНК у хвості. Значення індексу довжини хвоста (ІДХ) та індексу вмісту ДНК у хвості (ІВД) наведено у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Індекси пошкодження ДНК за результатами методу ДНК-комет

	концентрація, мкМ					
	1		20		100	
Код препарату	ІДХ	ІВД	ІДХ	ІВД	ІДХ	ІВД
Paclitaxel	2,03	0,51	2,03	1,22	1,68	1,13
Benomyl	1,84	1,4	2,44	1,63	1,79	0,20

З наведених даних виявляється, що беноміл у низькій концентрації викликає менш інтенсивне пошкодження ДНК, ніж паклітаксел, а зі збільшенням дози його руйнівний вплив на ДНК зростає і перевищує паклітаксел. Отримані дані аналізувалися шляхом розрахунку коефіцієнта пошкоджень. Для цього було проведене умовне ранжування комет на 5 груп за двома різними критеріями, а саме: за довжиною хвоста і за відсотковим вмістом ДНК у ньому (рис. 3.9).

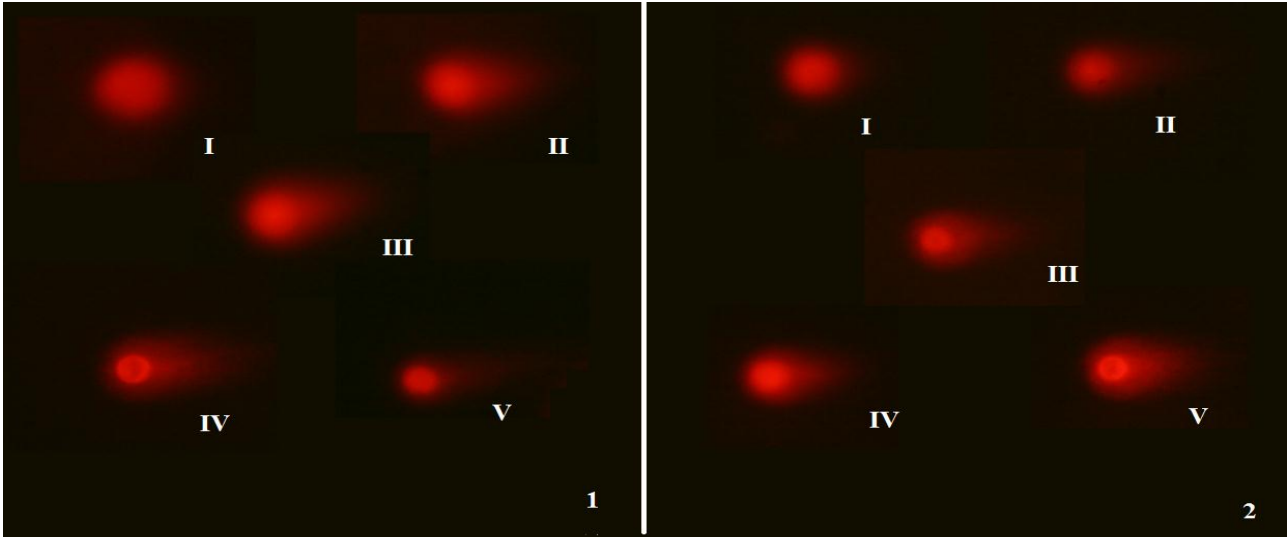


Рис. 3.9 Групи комет: 1 – ранжування за довжиною хвоста, 2 - ранжування за відсотковим вмістом ДНК у хвості

Коефіцієнт пошкодження вираховувався за наступною формулою:

$$I_{dc} = ((0 \cdot n \text{ I}) + (1 \cdot n \text{ II}) + (2 \cdot n \text{ III}) + (3 \cdot n \text{ IV}) + (4 \cdot n \text{ V})) / \sum n,$$

де n – це кількість.

Методом ДНК-комет було проведено аналіз характеру впливу на клітини паклітакселу та беномілу. За результатами дослідження (табл.3.3) інтенсивність хвоста комет, довжина хвоста і відсоток вмісту ДНК у хвості комети більший при дії беномілу. Таким чином, беноміл викликає сильніші пошкодження ДНК, ніж паклітаксел. Виходячи з того, що хвіст ДНК-комети складається з фрагментованої ДНК, яка піддалася електрофоретичному розділенню за молекулярною масою, довший хвіст містить більше коротких фрагментів ДНК, що свідчить про велику кількість одно- і двониткових розривів, а отже, значну цитотоксичну активність. За показником вмісту ДНК у хвості беноміл також перевищує паклітаксел.

Таблиця 3.3

Характер впливу контрольних препаратів

	Паклітаксел	Беноміл
Загальна площа	41780,76 ± 16559,8	47837,37 ± 21131,97
Загальна інтенсивність	50,31855 ± 12,78205	53,75133 ± 11,76631
Загальна довжина	271,2258 ± 70,14374	305,8167 ± 66,50691
Загальний вміст ДНК	2070691 ± 748752,1	2555540 ± 1202168
Площа хвоста	14048,94 ± 11008,14	20382,86667 ± 9277,63598
Інтенсивність хвоста	19,3529 ± 7,688784	23,95268256 ± 8,142543554
Довжина хвоста	87,91935 ± 56,89573	125,2333 ± 50,91847
% ДНК в хвості	15,42371 ± 15	21,15452 ± 12,91179

Ці результати вказують на те, що беноміл здатен завдати більш серйозних пошкоджень раковим клітинам, ніж паклітаксел (рис. 3.10).

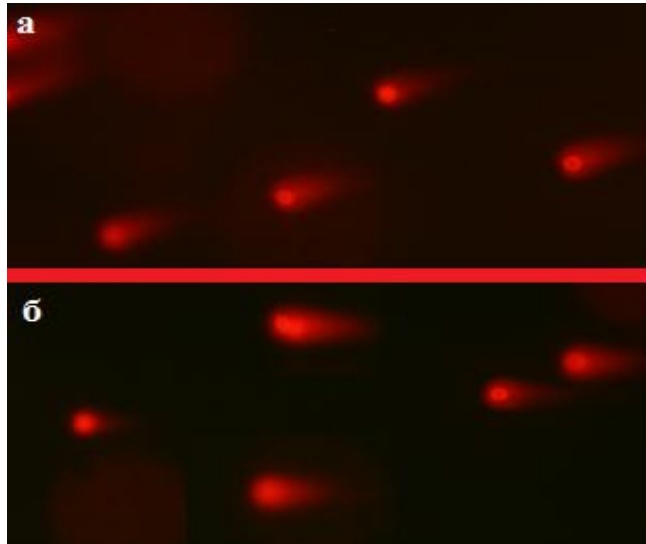


Рис. 3.10. ДНК-комети: а – на дію паклітакселу, б – на дію беномілу

Цю думку підтверджують отримані ДНК індекси. Так, у наслідок ранжування комет за довжиною хвоста: I_{dc} паклітакселу = 1,565, I_{dc} беномілу = 2,167. При ранжуванні за відсотковим вмістом ДНК у хвості, індекси наступні: I_{dc} паклітакселу = 0,984, I_{dc} беномілу = 1,583.

3.5. Визначення цитотоксичного впливу досліджуваних препаратів за допомогою методу ДНК-комет

В якості негативних контролів у тесті використовували беноміл і піклітаксел. Значення індексу довжини хвоста (ІДХ) та індексу вмісту ДНК у хвості (ІВД) наведено у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Індекси пошкодження ДНК за результатами методу ДНК-комет

Код препарату	Концентрація, мкМ					
	1		20		100	
	ІДХ	ІВД	ІДХ	ІВД	ІДХ	ІВД
Glutapirone	0,33	0,15	0,61	0,38		
AV-153-Li (IOS-1262)	0,51	0, 22	0,83	0,44		
Paclitaxel	2,03	0,51	2,03	1,22	1,68	1,13
Benomyl	1,84	1,4	2,44	1,63	1,79	0,20

Приклади комет, які було відібрано для виконання розрахунків, наведено на рис 3.11.

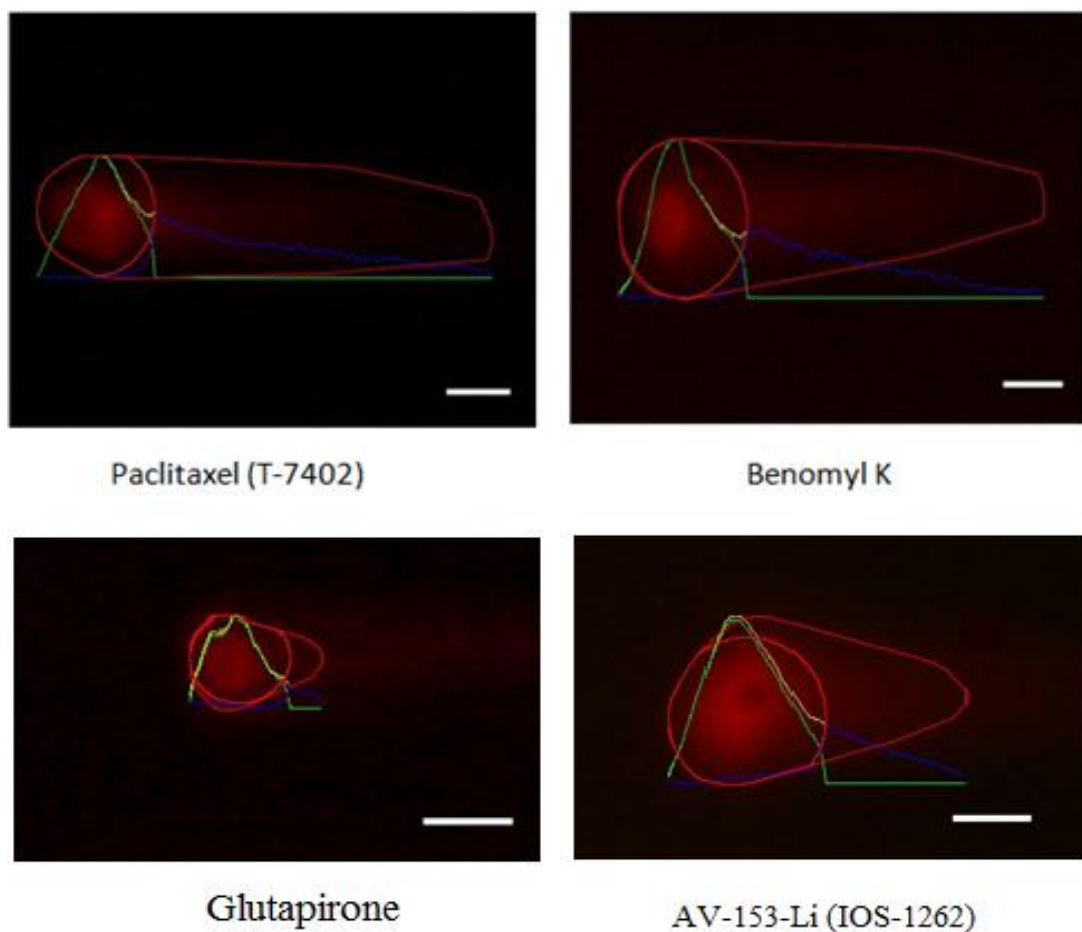


Рис. 3.11. ДНК-комети, отримані після обробки клітини MCF-7 контрольними препаратами та препаратами похідних 1,4 дигідропіридину. Лінія масштабу відповідає 20 мкм.

З наведених даних можна зробити кілька висновків. По-перше, беноміл у низькій концентрації викликає менш інтенсивне пошкодження ДНК, ніж паклітаксел, а зі збільшенням дози його руйнівний вплив на ДНК дещо зростає. По-друге, досліджені препарати діють на клітини дуже слабо, в порівнянні з контрольними препаратами. Зокрема, показники ІДХ та ІВД препаратів Glutapirone та AV-153-Li (IOS-1262) не перевершує обидва контрольних препарати. Отже, чим коротший хвіст, тим менше він містить коротких фрагментів ДНК, що свідчить про малу кількість одно- і двониткових розривів, а отже, низьку цитотоксичну активність.

За показником вмісту ДНК у хвості препарати похідних 1,4-дигідропіридину не перевищують контрольних препаратів. Даний показник вимірюється як інтенсивність забарвлення хвоста, що залежить від кількості зв'язаного з ДНК барвника у кожній його точці. Індекс вмісту ДНК у хвості відображає кількість пошкодженої ДНК, що здатна до розділення під час електрофорезу.

Отже, як видно з даних, препарати похідних 1,4-дигідропіридину мають дуже незначну кількість одно- і двониткових розривів, а це в свою чергу свідчить про нетоксичність цих препаратів. Отже препарати Glutapirone та AV-153-Li (IOS-1262) можуть використовувати в подальшій розробці радіопротекторних препаратів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Онкологічні захворювання – одна з основних причин смертності в Україні та в світі. Найпоширенішим методом їх лікування є променева терапія, але вона поряд з лікуванням призводить до негативних наслідків на здорові клітини. Тому, з кожним днем все ширше використовують засоби, що захищають від шкідливої дії радіації.

Потенційні радіопротектори не повинні перешкоджати дії протипухлинних препаратів, мати низьку ціну (у випадку синтетичних, що стосується ціни їх виготовлення), мати обширний вплив на весь організм та в ідеалі він повинен захищати організм від усіх видів іонізуючого випромінювання. Також радіопротектори мають діяти різними механізмами, що забезпечуватиме комплексний захист та діяти при досить низьких концентраціях. Але найголовнішою вимогою, котра висувається до радіопротекторів, є низька цитотоксична активність.

На сьогодні розроблену достатньо велику кількість препаратів, що мають радіопротекторну дію та використовуються в процесі запобігання, пом'якшення та лікування негативних наслідків опромінення. Але вчені не припиняють дослідження нових потенційних радіопротекторних засобів, котрі матимуть низьку цитотоксичність.

Препарати похідні 1,4-дигідролпіридину володіють дуже широким діапазоном властивостей від протипухлинних до радіопротекторних. На сьогодні досліджено дуже велику кількість препаратів і доведено, що багато з них є потужними радіопротекторами. Дані щодо ефективної радіопротекторної дії препаратів похідних 1,4-дигідролпіридину відомі вже в літературі. Наприклад, Fernandez зі співавторами дослідили радіопротекторну дію Glutapirone та захисні властивості по відношенню до окиснювального стресу, але лише при концентраціях вище 100 мкМ [60]. Тому дослідження цитотоксичності цього препарату є актуальним питанням, адже він має широке використання.

Метою нашої роботи було дослідження цитотоксичної дії препаратів AV-153-Li (IOS-1262) та Glutapirone – похідних 1,4-дигідропіридину та підтвердження їх низької цитотоксичної активності. Для порівняння цитотоксичності нам необхідно було взяти негативний контроль. В якості негативного контролю виступили препарати паклітаксел та беноміл, адже відомо, що вони є цитотоксичними. Дослідження цитотоксичності досліджуваних препаратів проводили шляхом порівняння з контрольними препаратами з використанням МТТ-тесту та методу ДНК-комет. Також для визначення морфологічних змін в культурі клітин MCF-7 було порівняно контроль до введення та після введення досліджуваних препаратів, а також порівняння з контрольними препаратами.

Дані щодо цитотоксичності препаратів похідних 1,4-дигідропіридину отримані методом ММТ-тесту на сьогоднішній день вже відомі. Наприклад, у роботі Razzaghi-Asl та співавторів досліджено, що деякі похідні мали високу цитотоксичність, деякі середню і деякі низьку. Ними було підтверджено, що введення *N*-тіазолкарбонільної групи в положення С3 і С5 кільця дигідропіридину призводила до збільшення цитотоксичної активності [61]. А Tamgali та співавторами було виявлено що заміщення на групи -OCH₃ та -ОН в положенні *-para* посилює цитотоксичність похідних. Отже, можна припустити, що від замісників та їх положення в кільці дигідропіридину залежить рівень цитотоксичної активності [62]. В нашій роботі, методом МТТ-тесту, було вперше досліджено препарати AV-153-Li (IOS-1262) та Glutapirone і підтверджено їх дуже низьку цитотоксичність у порівнянні з іншими препаратами похідних 1,4-дигідропіридину, що були вже раніше описані. Цей факт підкреслює перспективність цієї роботи та можливість використання цих препаратів у створенні лікарських радіопротекторних препаратів.

Варто зазначити, що метод ДНК-комет зазвичай не використовується для первинного скринінгу потенційних радіопротекторних препаратів, що підкреслює новизну роботи. ДНК-комети, отримані після обробки клітин

MCF-7 досліджуваними сполуками, підтверджують дані МТТ-тесту щодо нетоксичності похідних 1,4-дигідропіридину.

Отже, нами було вперше отримано результати експериментальних досліджень цитотоксичної дії препаратів AV-153-Li (IOS-1262) та Glutaripone на культурі клітин MCF-7 *in vitro*, що дозволяє в подальшому провести дослідження *in vivo* та екстраполювати отримані результати цитотоксичного впливу на організм людини.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що вплив досліджуваних препаратів на культуру клітин MCF-7 не призвів до зменшення щільності клітинної популяції протягом 1-4 діб культивування, тобто проліферативна активність клітин не зменшилася.
2. Було виявлено, що мітотичний індекс культивованих клітин не падав і на 4-ту добу культивування було спостережено його максимум: для Glutapirone – 55‰ та для AV-153-Li (IOS-1262) – 53‰.
3. Встановлено, що індекс гігантських полікаріоцитів майже не відрізнявся від контролю і становив 17 ‰ для Glutapirone та 19‰ для AV-153-Li (IOS-1262).
4. За допомогою МТТ-тесту встановлено, що під впливом препарату Glutapirone на культуру клітин MCF-7 відсоток життєздатних клітин становить 97% та 92% , а під впливом AV-153-Li (IOS-1262) 96% та 91% при концентрації 1 і 5 мкМ відповідно, що свідчить про відсутність цитотоксичної активності.
5. За індексами пошкодження ДНК клітин лінії MCF-7 обидва препарати мають низьку цитотоксичність, але її значення для Glutapirone є нищим. Так, значення ІДХ за концентрації 1 мкМ для Glutapirone та AV-153-Li (IOS-1262) становило 0,33 та 0,51 відповідно, за концентрації 20 мкМ – 0,61 та 0,83, а значення ІВД за концентрації 1 мкМ для Glutapirone та AV-153-Li (IOS-1262) становило 0,15 та 0,22 відповідно, за концентрації 20 мкМ – 0,38 та 0,44.
6. Препарати мають надзвичайно низьку цитотоксичність, тому вони є перспективними речовинами для проведення подальших розробок радіопротекторних препаратів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Наталія ЄУ. Радіопротектори: сучасний стан проблеми. *Український радіологічний журнал* 2014; 11(4): 42-49.
2. Дружина М, Мойсєєв А, Ліпська Ю, Гринєвич Ю. Радіаційні ураження і радіопротектои. *Віс. НАН України* 2005; 4: 17-24.
3. Xiao L, Tsutsui T, Miwa N, The lipophilic vitamin C derivative, 6-*o*-palmitoylascorbate, protects human lymphocytes, preferentially over ascorbate, against X-ray-induced DNA damage, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2014; 394: 247-259. Doi: 10.1007/s11010-014-2101-8.
4. Gilbert ES. Ionizing radiation and cancer risks: what have we learned from epidemiology. *Int J Radiat Biol* 2009; 85: 467-482.
5. Гребенюк АН, Зацепин ВВ, Тимошевський АА. *Медицина катастроф* 2007; 3(59): 32-35.
6. Власенко ТН, Назаров ВБ, Гребенюк АН. Фармакологія 2010; 8(11): с. 230-253.
7. Малькута АН. Организация медицинской помощи населению в чрезвычайных условиях под ред.: ФГУП «Издательство военной и военно-технической литературы» 2001: с. 248–254.
8. Waselenko JK, MacVittie TJ, Blakely WF, et al. Medical Management of the Acute Radiation Syndrome: Recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. *Annals of Internal Medicine* 2004; 140(12): 1037–1051.
9. Citrin, Cotrim, Hyodo et al. Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *The Oncologist* 2010; 15: 360–371.
10. Moding EJ, Kastan MB, Kirsch DG, Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nat RevDrug Discov* 2013; 12(7). Doi: 10.1038/nrd4003.

11. Кузин АМ. Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии. *Наука* 1970; с. 119.
12. Wang H, Mu X, He H, Zhang X. Cancer radiosensitizers. *Trends Pharmacol Sci* 2018; 39: 24–48.
13. Эйбус ЛХ, Корыстов Ю.Н. Кислород в радиобиологии. *Энергоиздат* 1984; 177.
14. Тимофеев-Ресовский ЮН, Савич АВ, Шальнов МИ. Введение в молекулярную радиобиологию. *Медицина* 1981; 318.
15. Эйбус ЛХ. Физико-химические основы радиобиологических процессов и защиты от излучений. *Атомиздат* 1979; 216.
16. Wirsdorfer F, Jendrossek V. The role of lymphocytes in radiotherapy-induced adverse late effects in the lung. *Front Immunol* 2016; 7: 591.
17. Wang H, Mu X, He H, Zhang XD. Cancer radiosensitizers. *Trends Pharmacol Sci* 2018; 39: 24–48.
18. Citrin D, Cotrim AP, Hyodo F, Baum BJ, Krishna MC, Mitchell JB. Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. *Oncologist* 2010; 15: 360–371.
19. Wenjie W, Changhu X, Xiangzhao M. Radioprotective effects and mechanisms of animal, plant and microbial polysaccharides. *International journal of biological macromolecules* 2020; 153: 373-384. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.203.
20. Владимиров ВГ, Красильников ИИ, Арапов СВ. Радиопротекторы: Структура и функция. Наук: Думка; 1989. 1989. – 261 с.
21. Bourcier C, Levy A, Vozenin MC, Deutsch E. Pharmacological strategies to spare normal tissues from radiation damage: useless or overlooked therapeutics. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31: 699–712.
22. Luo JZ, Luo L . Ginseng on hyperglycemia: effects and mechanisms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009; 6: 423–427.
23. Жеребченко ПГ. Противолучевые свойства индолалкиламинов. *Атомиздат* 1971; 200.

24. Gonzalez E, Cruces MP, Pimentel E, Sanchez P. Evidence that the radioprotector effect of ascorbic acid depends on the radiation dose rate. *Environ Toxicol Pharmacol* 2018; 62: 210–214.
25. Tabeie F, Tabatabaei SM, Mahmoud-Pashazadeh A, Assadi M. Radioprotective effect of beta D-glucan and vitamin E on gamma irradiated mouse. *J Clin Diagn Res* 2017; 11: 8–11.
26. Gil-Im M, Seoyoung K, Eun C, Cha Soon K, Yun-Sil L. Pharmacology of natural radioprotectors. *Arch Pharm Re.* 2018; 41(11): 1033–1050. Doi: 10.1007/s12272-018-1083-6.
27. Whitnall MH, Inal CE, Jackson WE, Miner VL, Villa V, Seed TM. In vivo radioprotection by 5-androstenediol: stimulation of the innate immune system. *Radiat Res* 2001; 156: 283–293.
28. Painuli ., Kumar N. Prospects in the development of natural radioprotective therapeutics with anti-cancer properties from the plants of Uttarakhand region of India. *J Ayurveda Integr Med* 2016; 7: 62–68.
29. Citrin D, Cotrim AP, Hyodo F., Baum BJ, Krishna MC, Mitchell JB. Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. *Oncologist* 2010; 15: 360–371.
30. Pal S, Saha C, Dey SK. Studies on black tea (*Camellia sinensis*) extract as a potential antioxidant and a probable radioprotector. *Radiat Environ Biophys* 2013; 52: 269–278.
31. Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the radiologist. Philadelphia 2012; 576.
32. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010; 4:118–126.
33. Di Maggio FM, Minafra L, Forte GI, Cammarata FP, Lio D, Messa C, Gilardi MC, Bravata V. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. *J Inflamm* 2015; 12-14

34. Straub JM, New J, Hamilton CD, Lominska C, Shnayder Y, Thomas SM. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141:1985–1994.
35. Lee JC, Krochak R, Blouin A, Kanterakis S, Chatterjee S, Arguiri E, Vachani A, Solomides CC, Cengel KA, Christofidou-Solomidou M. Dietary flaxseed prevents radiation-induced oxidative lung damage, inflammation and fibrosis in a mouse model of thoracic radiation injury. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 47–53.
36. Sharygin VL, Pulatova MK, Shliakova TG, Mitrokhin IuI, Todorov IN. Activation of deoxyribonucleotide synthesis by radioprotectants and antioxidants as a key stage in formation of body resistance to DNA-damaging factors. *Izv Akad Nauk Ser Biol* 2005; 4: 401–422.
37. Guo CY, Luo L, Urata Y, Goto S, Huang WJ, Takamura S, Hayashi F, Doi H, Kitajima Y, Ono Y, Ogi T, Li TS. Sensitivity and dose dependency of radiation-induced injury in hematopoietic stem/progenitor cells in mice. *Sci Rep* 2015; 5: 8055.
38. Dumont F, Le Roux A, Bischoff P. Radiation countermeasure agents: an update. *Expert Opin Ther Pat* 2010; 20: 73–101.
39. Schaue D, Kachikwu EL, McBride WH. Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat Res* 2012; 178: 505–523.
40. Strom E, Sathe S, Komarov PG, Chernova OB, Pavlovska I, Shyshynova I, Bosykh DA, et al. Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 474–479.
41. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, et al. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 2015; 106: 4131–4138.

42. Xu Y, Dong H, Ge C, Gao Y, Liu H, Li W, Zhang C. CBLB502 administration protects gut mucosal tissue in ulcerative colitis by inhibiting inflammation. *Ann Transl Med* 2016; 4: 301.
43. Knatko EV, Ibbotson SH, Zhang Y, Higgins M, Fahey JW, Talalay P, et al. Nrf2 activation protects against solar-simulated ultraviolet radiation in mice and humans. *Cancer Prev Res* 2012; 8: 475–486.
44. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:545–555.
45. Kim HP, Morse D, Choi AM. Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets* 2006; 10: 759–769.
46. Milam JE, Keshamouni VG, Phan SH, Hu B, Gangireddy SR, Hogaboam CM, et al. PPAR-gamma agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294: 891–901.
47. Mangoni M, Sottili M, Gerini C, Desideri I, Bastida C, Pallotta S, et al. A PPAR-gamma agonist protects from radiation-induced intestinal toxicity. *United Eur Gastroenterol J* 2017; 5: 218–226.
48. Coleman CN, Sullivan MO, Bader LJ, Murrain-Hill P, Koerner JF, Garrett AL. Public Health and Medical Preparedness for a Nuclear Detonation: The Nuclear Incident Medical Enterprise. *Health Phys* 2016; 108(2): 149–160. Doi: 10.1097/HP.0000000000000249.
49. Thotala D, Chetyrkin S, Hudson B, Voziyan P, Yazlovitskaya E. Pyridoxamine protects intestinal epithelium from ionizing radiation-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47(6): 779-85. Doi: 10.1016/j.
50. Wang Y, Meng A, Lang H, Brown SA, Konopa JL, Kindy MS, et al. Activation of nuclear factor kappaB in vivo selectively protects the murine small intestine against ionizing radiation-induced damage. *Cancer Res* 2004; 64: 6240–6246. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0591

51. Crescenti E, Croci M, Medina V, Sambuco L, Bergoc R and Rivera E. Radioprotective potential of a novel therapeutic formulation of oligoelements Se, Zn, Mn plus Lachesis muta venom. *J Radiat Res* 2009; 50: 537–544. Doi: 10.1269/jrr.09060
52. Лебедев ВГ, Мороз ББ, Дешевой ЮБ. Радиационная биология. *Радиоэкология* 2002; 42(1): с. 60–64.
53. Isenberg JS, Maxhimer JB, Hyodo F, Pendrak ML, Ridnour LA, DeGraff WG, et al. Thrombospondin-1 and CD47 limit cell and tissue survival of radiation injury. *Am. J. Pathol* 2008; 173: 1100–1112. Doi: 10.2353/ajpath.2008.080237
54. Bertho JM, Frick J, Prat M, Demarquay C, Dudoignon N, Trompier F, et al. Comparison of autologous cell therapy and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) injection vs. G-CSF injection alone for the treatment of acute radiation syndrome in a non-human primate model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* 2005;63(3): 911–20. Doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.03.045
55. Білько НМ. Методи експериментальної гематології. К.:Видавничий дім «Києво-Могилянська академія» 2006: с. 66.
56. Rodriguez-Burford C. The use of dimethylsulfoxide as a vehicle in cell culture experiments using ovarian carcinoma cell lines. *Biotech Histochem* 2003; 78(1): 17–21.
57. Azqueta A, Slysikova J. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in genetics* 2014; 5(288): 1–8.
58. Olive PL. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protocols* 2006: 1(1); 23–29.
59. Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS. Opencomet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology* 2014; 2(1):457–465.
60. Fernandes MA, Santos MS, Vicente JA, Moreno AJ, Velená A, Duburs G, Oliveira CR. Effects of 1, 4-dihydropyridine derivatives (cerebrocrast,

gammapyrone, glutapyrone, and diethone) on mitochondrial bioenergetics and oxidative stress: a comparative study. *Mitochondrion* 2003; 3(1):47-59.

61. Razzaghi-Asl N, Miri R, Firuzic O. Assessment of the Cytotoxic Effect of a Series of 1, 4-Dihydropyridine Derivatives Against Human Cancer Cells. *Iran J Pharm Res* 2016; 15(3): 413–420.

62. Tangali RRN. Therapeutic Significance of 1,4-Dihydropyridine Compounds as Potential Anticancer Agents. [Online First], IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.89860. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/therapeutic-significance-of-1-4-dihydropyridine-compounds-as-potential-anticancer-agents>