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 «**ВПЛИВ НЕЙТРОНОЗАХВАТНИХ АГЕНТІВ ІЗ ФОТОСЕНСИБІЛІЗУЮЧИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ НА КЛІТИНИ *in vitro* ЗА УМОВ ДІЇ СВІТЛОВОГО ТА ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАНЬ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання
Галузь знань: 09 Біологія
Спеціальність: 091 Біологія
Освітньо-наукова програма: Лабораторна діагностика біологічних систем
Кравченко Олександра Русланівна

Наукові керівники:
к. б. н., доц. каф. лабораторної діагностики біологічних систем Руссу І. З.

зав. лабораторії клітинної радіобіології відділу радіобіології Інституту експериментальної радіології,
ДУ «ННЦРМ НАМН України»
д. б. н., с. н. с., проф. Лавренчук Г.Й.

Рецензент
Талько В. В.,
доктор медичних наук, професор

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____
Секретар ЕК
Пахаренко М. В.
«____» червня 2021 року

Київ – 2021

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

5-АЛК	– 5-амінолевулінова кислота
^{60}Co	– радіоізотоп кобальту-60
BSH	– борний сульфгідрил
C3H/An	– лінія мишей чоловічої статі
HpD	– гематопорфірин
L_{929}	– перманентно проліферуюча культура клітин
RPMI 1640	– тип поживного середовища для культур клітин
$\Delta\Psi m$	– мембранний потенціал мітохондрій
АР-1	– активатор протеїну-1
АТФ	– аденозинтрифосфат
АФК	– активні форми кисню
БНЗТ	– борнейтронозахватна терапія
ВВР-М	– водо-водяний атомний реактор
ВРА	– бор фенілаланін
ГА	– гідроксиапатит
ДМСК	– *мезо*-2,3-димеркаптосукцинова кислота
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ДТПК	– діетилентриамінпентаоцтова кислота
ЗФР	– забуферений фізіологічний розчин
ІВ	– іонізуюче випромінювання
ІЧ	– інфрачервоне випромінювання
ЛПЕ	– лінійна передача енергії
НАДФН	– нікотинаміддинуклеотид фосфат відновлений
НЗА	– нейтронозахватний агент
НЗС	– нейтронозахватная сіновектомія
НЗТ	– нейтронозахзватна терапія
НЛВ	– низькоінтенсивне лазерне випромінювання
ПОЛ	– пероксидне окиснення ліпідів

РА – ревматоїдний артрит

С3Н – лінія мишей

ФДТ – фотодинамічна терапія

ФЛ – фосфоліпіди

ФС – фотосенсибілізатори

цАМФ – циклічний аденозинмонофосфат

ЧС – світло червоного спектру

ВСТУП

Онкологічну захворюваність, у зв'язку з її бурхливим зростанням у світі, можна без перебільшення назвати хворобою XXI століття. Згідно з даними інформаційного бюлетеня ВООЗ, у 2008 році кількість смертей від раку на планеті склало 7,6 мільйонів. Прогнозують, що до 2030 року ця цифра зросте до 12 мільйонів. Відсоток смертності від онкологічної патології склав 13 % від усіх видів смертності [1]. Тому пошук нових технологій лікування хворих на злоякісні пухлини залишається провідним напрямком онкології. При цьому роль променевої терапії та ядерної медицини у світі зростає.

Негативною властивістю традиційної конвенціональної променевої терапії є те, що при опроміненні пухлини опромінюються також здорові тканини, особливо коли пухлина має складну конфігурацію і локалізацію. Нейтронзахватна терапія (НЗТ) – метод бінарної променевої терапії, заснований на опроміненні тепловим або епітепловим потоком нейтронів пухлинних клітин, збагачених атомами, що володіють великим перерізом захоплення нейтронів бору, гадолінію [2, 3, 4]. Завдяки селективному накопичення бору або гадолінію в пухлинних клітинах, при опроміненні їх нейтронними потоками, пухлина одержує терапевтичну дозу опромінення, при істотному збереженні нормальних оточуючих тканин, тобто досягається повна «комфортність» опромінення [5, 6]. Отже, нейтронзахватна терапія є перспективним методом лікування пухлин, які погано піддаються лікуванню традиційними методами. Принцип дії її полягає в наступному: при зіткненні епітеплових потоків нейтронів з атомами препаратів, що володіють великим перерізом їх захоплення (бор, гадоліній) та вибірково накопипичуються в пухлинних клітинах, відбувається ядерна реакція і вивільнення великої кількості енергії [3, 4]. Все це подібно до вибуху ядерної бомби у межах пухлинної клітини.

Все вищезазначене визначило мету, завдання, об’єкт та предмет дослідження науково-дослідної роботи

Мета: вивчення біологічної ефективності нейтронозахватних агентів із фотосенсибілізуючими властивостями у культурі клітин при опромінені світловим та іонізуючим випромінюванням.

Завдання роботи:

1. Вивчити морфофункціональні характеристики культури фібробластоподібних клітин (структура популяції, проліферативна та мітотична активність, апоптоз) при дії різних доз гамма-випромінювання ^{60}Co, нейтронозахватних агентів з молекулярною структурою і магнітокерованих нанокомплексів та червоного світла.

2. Дослідити комбінований вплив нейтронів спектру поділу, нейтронозахватних агентів з молекулярною структурою та магнітокерованих нанокомплексів і червоного світла на життєздатність клітин експериментальної моделі пухлинного росту.

3. Встановити особливості формування біологічних ефектів у клітинах при комбінованій дії НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями, світлового та іонізуючого випромінювання.

Об’єкт дослідження – морфофункціональні характеристика культури фібробластоподібних клітин

Предмет дослідження – поєднаний вплив теплових нейтронів, світлового опромінення червоного діапазону та нейтронозахватних агентів з фотосенсибілізуючими властивостями на клітини у культурі *in vitro.*

РОЗДІЛ 1.
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Метод нейтронозахватної терапії

Нейтронзахватна терапія – це область медицини, що вимагає мультимодального підходу і для продуктивного використання якої необхідна робота фахівців різних напрямів (променевих терапевтів, онкологів, ядерних фізиків, фізиків-дозиметристів) [2, 3]. Слід також зазначити, що всі розробки в області нейтронзахватної терапії поки перебувають на стадії досліджень, метою яких є підтвердження ефективності клінічних випробувань.

Для впровадження даної технології в клінічну практику необхідно пройти шлях від формування нейтронного пучка до розробки методології опромінення.

В основі НЗТ лежить неоднакова ймовірність ініціації ядерних реакцій при взаємодії теплових нейтронів з атомами, що характеризуються різним перерізом захоплення.[10, 11, 13]. Прийнятну якість подібних нейтронних пучків з відповідним рівнем колімації, розмірами терапевтичної апертури і необхідною щільністю потоку нейтронів (бажано не менше 2 – 3×10^9 n/см^2) в зоні позиціонування пацієнта забезпечує лише дуже невелике число ядерних реакторів, розташованих, як правило, у великих дослідних центрах, далеко від спеціалізованих медичних установ.

Починаючи з п'ятдесятих років минулого століття – часу перших спроб клінічної реалізації НЗТ за допомогою сполук бору, проблема селективної доставки ^{10}B до мішені і по сьогоднішній день залишається основною, хоча й далеко не єдиною. Серед сполук бору на даний момент найбільш повно досліджені в клінічних умовах боркаптат або борний сульфгідрил (BSH - $Na^2B^{12}H^{11}SH$) і L-борфенілаланін (BPA) [14-15].

Найбільший клінічний досвід накопичений при БНЗТ мультиформних гліобластом (~ 350 хворих) і значно менший – при меланомах і інших

злоякісних новоутвореннях. Незважаючи на те, що прогрес очевидний, отримані до цього часу результати далекі від бажаних. Основні напрями розвитку цього методу стосуються створення компактних спеціалізованих джерел надтеплових нейтронів, методів визначення концентрації бору в тканинах в реальному масштабі часу і розробки нових селективних туморотропних носіїв пошкоджуючих агентів. Сьогодні для визначення концентрації бору в пухлинах і здорових тканинах експериментально досліджуються мічені ^{18}F BPA-похідні. Не слід скидати з рахунків і можливості прямого виміру концентрації ^{10}B з використанням мікроінвазивних технологій. Очевидно, що точна оцінка концентрації бору в режимі реального часу дозволить виконати адекватний розрахунок доз і створити оптимальний індивідуальний план опромінення для кожного конкретного пацієнта [7, 12, 15, 16].

Для підвищення концентрації бору в пухлині, в разі застосування традиційних носіїв BSH і BPA, пропонується використовувати їх комбінацію, збільшити час інфузії препаратів, а також вводити ці сполуки в умовах індукованого гіперосмолярного шоку, що приводить до тимчасового порушення гематоенцефалічного бар'єру[8, 9].

Проте істотне підвищення градієнта концентрації бору на кордоні пухлина – здорова тканина можливе, мабуть, лише з допомогою нових туморотропних носіїв, що володіють більшою, ніж нинішні вибірковістю [16, 17].

Орієнтиром для новостворюваних боровмісних препаратів повинен слугувати необхідний для повноцінної реалізації БНЗТ рівень концентрації бору: 10–30 мкг / г пухлинної тканини (або 109 атомів бору на клітину) [18].

^{157}Gd, що є альтернативою ^{10}B при НЗТ, має практично максимальний переріз захвату серед стабільних ізотопів: 254000 барн у гадолінію, проти 3840 барн – у бору. Результатом реакції нейтронного захоплення ^{157}Gd (n, γ) ^{158}Gd є емісія γ-квантів з енергією 7,8 МеВ, що супроводжується емісією електронів Оже з енергією ≤ 41 кеВ. Це і визначає особливості пошкодження

тканин при можливому використанні ^{157}Gd в якості агента для НЗТ – не тільки безпосередньо поблизу атома гадолінію, а й, враховуючи значну проникаючу здатність γ-квантів зазначеної енергії – на відстані. Останній фактор може мати як негативне, так і позитивне значення.

Найбільш важливою проблемою при реалізації НЗТ з використанням ^{157}Gd, як і при БНЗТ, є можливість селективної доставки агента до пухлини. Це підтверджує важливість пошуку нових спеціалізованих туморотропних носіїв пошкоджуючих агентів – одного з найбільш актуальних завдань клінічної онкології [5, 18, 19]. Однак за такого підходу виникає проблема токсичності таких НЗА не тільки для клітин пухлини, а й для нормальних клітин, зокрема для клітин крові.

Одним із нових підходів для зменшення променевого навантаження на нормальні клітини є поєднання НЗТ із фотодинамічною терапією (ФДТ).

1.2 Метод фотодинамічної терапії

ФДТ заснована на взаємодії оптичного випромінювання певної довжини хвилі з молекулою фотосенсибілізатора. В результаті утворюються цитотоксичні агенти (синглетний кисень і вільні радикали), що діють клітинні елементи пухлинної тканини [20, 21].

Фоточутливість – загальна властивість вищих тварин, що має фізіологічне значення [20–23]. Світло поглинається ендогенними хромофорами клітин або тканин. Мітохондрії знаходяться в центрі багатьох різноманітних клітинних функцій інтегрування сигналів між органелами і ядром. Ще в 1981 році було запропоновано, що фоточутливість може бути спільною властивістю мітохондрій у вищих тварин. Поглинання фотона викликає зміну молекулярної конфігурації фотоакцептора, що пов'язано із зміною функції первинних реакцій, і в подальшому призводить до зміни в клітинній сигналізації та функції вторинних реакцій. Первинні реакції після поглинання світла, а саме: синглетно-киснева гіпотеза, гіпотеза зміни

окислювально-відновних властивостей, гіпотеза впливу оксиду азоту та гіпотеза дії супероксид-аніону. Вторинними реакціями після поглинання світла є клітинні сигнальні шляхи, що підключають мітохондріальну ретроградну сигналізацію ($\Delta\Psi m$, АФК, Ca^{+2}). Ці біохімічні та клітинні зміни призводять до макроскопічних ефектів, таких як збільшення клітинної проліферації або, наприклад, прискореного загоєння ран.

ФДТ відносно швидко зайняла місце в онкології та виявилася ефективною при важких дисплазіях, початкових поверхнево розташованих пухлинах різних локалізацій, рецидивах і внутрішньошкірних метастазах після хірургічного, променевого або комбінованого лікування, а також у хворих з тяжкою вікової або супутньою патологією [23 – 28]. Паліативно ФДТ проводять для лікування поширених обтуруючих раках стравоходу, шлунка, трахеї, товстої кишки з метою реканалізації стенозованого органу та покращення якості життя. Безсумнівною перевагою методу ФДТ перед традиційними методами лікування в онкології є: висока вибірковість при мінімальному пошкодженні здорових тканин, руйнування пухлин у важкодоступних зонах, можливість багаторазового повторення лікувального процесу та комбінованої терапії, відсутність тяжких системних ускладнень, відносно низька вартість, а також одночасне проведення як лікувального, так і діагностичного впливу. Побічним ефектом методу ФДТ є фоточутливість шкіри до сонячного світла, яка може тривати від 24 годин до 6 тижнів залежно від використовуваного ФС. Основне обмеження методу ФДТ – глибина дії лазерного випромінювання. Використовувані в клініці фотосенсибілізатори мають спектр фотодинамічного впливу з максимумами в області 630 – 670 нм.

Проникність біологічних тканин в ефективному діапазоні довжин хвиль у ФС, які використовуються в даний час, незначна і складає всього кілька міліметрів. Відомо, що найбільш прозорий діапазон для проникнення світла в біологічну тканину знаходиться в далекій червоній та ближній інфрачервоній (ІЧ) областях і становить 650 – 800 нм, що відповідає

діапазону генерації ефективних, надійно працюючих і доступних лазерів [34]. До недоліків використовуваних в даний час ФС відносяться: труднощі зі стандартизацією препарату, невисока селективність накопичення в пухлинної тканини; повільне виведення з організму («Фотогем», «Фотосенс»), лікування не глибоко розташованих пухлин. Сказане вище свідчить про необхідність пошуку, створення і впровадження, нових ФС, що забезпечують ефективну генерацію синглетного кисню в далекій червоній області спектра, що володіють більш високою активністю і швидким виведенням з організму, а також відпрацювання оптимальних режимів терапії з ними.

На разі дослідження включають вивчення ефективності ФДТ при застосуванні деяких нових форм фотосенсибілізаторів, у тому числі, порфіринів, кон'югованих з антитілами [29], та порфіринів, комплексованих з нанорозмірними частками золота [33]. Зокрема, отримано кон'югат гематопорфірину з антитілами до фактора росту ендотеліоцитів, що має кращу фотодинамічну активність, ніж вихідний гематопорфірин, завдяки більшому накопиченню у пухлинних тканинах за рахунок додаткового зв'язування його з новоутворюваними судинами пухлини [30-32, 35].

У результаті аналізу великого обсягу експериментальних і клінічних матеріалів були сформульовані основні вимоги до оптимального фотосенсибілізатора. Перш за все, це низька темнова і світлова токсичність в терапевтичних дозах; висока селективність накопичення в тканинах злоякісних новоутворень і швидке виведення ФС зі шкіри та епітеліальної тканини; інтенсивне поглинання в спектральному діапазоні, де біологічні тканини мають найбільше пропускання (червоний і ближній ІЧ-діапазони); оптимум між величинами квантового виходу флуоресценції і квантового виходу інтерконверсії, яка визначає здатність ФС до генерації синглетного кисню; високий квантовий вихід синглетного кисню в умовах in vivo; доступність отримання або синтезу, однорідний хімічний склад; хороша розчинність у воді або дозволених для внутрішньовенного введення рідинах і кровозамінниках; стабільність при світловому впливі та зберіганні.

Останніми роками в кількох лабораторіях світу синтезовано сполуки, які об’єднують властивості нейтронозахватних агентів для НЗТ і фотосенсибілізаторів для ФДТ [36–42]. Синтез кон'югатів похідних хлорофілу а і бактеріохлорофілу а з поліедричними сполуками бору дозволяє не тільки збільшити селективність БНЗТ, але і здійснити комбіновану фотодинамічну і бор-нейтронозахватну терапію раку [38, 39].

Серед нових напрямків світового технологічного прогресу в медицині першочергової уваги заслуговують нанотехнології, які останнім часом виділилися в окрему дисципліну – наномедицину. Сучасні уявлення про молекулярно-біологічні зміни в клітинах і про можливості новітніх технологій, пов'язаних з використанням наноматеріалів, корінним чином змінили стратегію вирішення найбільш гострих проблем онкології, в першу чергу, – лікарської резистентності пухлин до цитостатиків [38 – 43].

Водночас слід відмітити, що понад три десятиріччя тому відкрито магніточутливі структури, які синтезує сам організм, – магніточутливі структури ендогенного походження [44]. Уперше їх знайшли в бактеріях, а пізніше у викопних залишках істот, датованих від прекембрійської ери, моллюсках, членистоногих, рибах, тваринах, тканинах мозку та інших органах людини.

Відомо, що при онкологічному процесі спостерігається підвищений рівень синтезу білків, через що виникає потреба в доставці до пухлини додаткової кількості різних компонентів, зокрема, іонів заліза. Залізо міститься в живих організмах головним чином у вигляді частинок гідратованого оксиду заліза, пов'язаних з білком феритином [38, 39]. Основним переносником заліза в організмі є трансферин. Це дає можливість використання його для доставки функціональних нанооб'єктів до областей посиленого синтезу білка. [42, 45].

РОЗДІЛ 2.
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА
ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом дослідження були біологічні ефекти в експериментальній моделі пухлинного росту – культурі клітин ссавців в умовах впливу нейтронозахватних агентів з фотосенсибілізуючими властивостями.

Дослідження виконані на культурі клітин лінії L_{929} (інша назва NCTC-clone 929, Clone of strain L) [46]. Первинний штам був отриманий з нормальної підшкірної жирової тканини 100-денної миші C3H/An чоловічої статі. Морфологічно культура клітин L_{929} є фібробластоподібною. Клітини L_{929} були обрані для дослідження через свою здатність до перманентного поділу. Культивування клітин проводили в повному поживному середовищі RPMI-1640 (4 ммоль/л L-глютаміну, 10 % ембріональної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину) згідно зі стандартними методами роботи з клітинними штамами [47, 50-52]. Клітини вирощували на покривних скельцях розмірами (16×8) мм до конфлуентного стану моношару (1–6 діб). Флакони інкубували в термостаті при 37°С впродовж 96 год, кожні 24 год готували морфологічні препарати по загальноприйнятій методиці (по 4 препарати на точку).

2.1 Інкубація клітин з нейтронозахватними агентами

У дослідженнях були використані як молекулярні НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями, такі як водорозчинна сіль 1-карба-*клозо*-додекарборат цезію (молекулярна маса 278 мг) – реагент А та {5,10,15,20-тетракис[*п*-(1'-карба-*клозо*-додекарборан-1'-іл)тетрафторфеніл]-17,18-дигідропорфірин} натрію (молекулярна маса 1565 мг) – реагент Б, так і нанокомпозити на основі гідроксиапатиту ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), який модифікований йонами гадолінію, що знаходиться в кристалічній ґратці гідроксиапатиту – реагент 1 та магнітокеровані нанокомпозити, синтезовані

із солей заліза із додаванням нітрату гадолінію ($Fe_3O_4/2Gd_2O_3$) – реагент 2, або ж додатково із вмістом бору – $Fe_3O_4/GdBO_3$ – реагент 3.

В наступному НЗА на поверхню магнетиту, модифікованого функціональними аміногрупами, хімічно закріпили ДТПК (діетилентриамінпентаоцтова кислота) і додали гадоліній (Fe_3O_4/γ-АПС/ДТПК-Gd) – це реагент 4. У реагенту 5 для надання біосумісності нанокомпозит 2 додатково модифікували гідроксиапатитом ($Fe_3O_4/2Gd_2O_3$/ГА), а в реагенту 6 проведено модифікацію поверхні *мезо*-2,3-димеркаптосукциновою кислотою (Fe_3O_4/ДМСК-Gd), яка зв'язується з гідроксильною групою поверхні магнетиту; гадоліній адсорбували з розчину сульфату гадолінію. Реагентом 7 слугувала магнітна речовина Fe_3O_4 з олеатом натрію. Методами рентгеноструктурного аналізу, рентгенівскої фотоелектронної спектроскопії, електронної мікроскопії колоїди охарактеризовані як полідисперсії, які складаються з частинок розмірами від 2 до 22 нм (при максимальному вмісті фракції ~ 7,5 нм). Нейтронозахватні агенти та їх характеристики надані провідним науковим співробітником Інституту ядерних досліджень НАН України Шевченком Юрієм Борисовичем.

Всі НЗА додавали в культуральне середовище через 24 год після посадки клітин (щоб вони не впливали на адгезію та розпластання клітин на скляній підложці). НЗА з молекулярною структурою (речовини А і Б) додавали у вигляді водного розчину в інтервалі концентрацій 0,005 ÷ 500 мкг/мл. Культивування клітин з НЗА здійснювали упродовж 5 діб.

2.2 Опромінення клітин червоним світлом

Після введення в поживне середовище культури клітин НЗА у різних концентраціях на експериментальній установці через 1 год проводили опромінення клітин, розробленій в Інституті ядерних досліджень НАН України для одночасного або послідовного опромінення культур клітин

червоним світлом (630 нм) від світлодіодів при постійній температурі 37°С. Визначали клітинні реакції при різних режимах опромінення (табл.2.1).

Таблиця 2.1

Розрахунок дози червоного світла для опромінення культури клітин лінії L_{929}

№ п/п	Параметри опромінювальної установки (питома потужність × експозиція)	Доза опромінення червоним світлом, Дж/см^2
1.	10 мВт/см^2 × 600 сек	6
2.	10 мВт/см^2 × 1200 сек	12
3.	50 мВт/см^2 × 600 сек	30
4.	50 мВт/см^2 × 1200 сек	60
5.	100 мВт/см^2 × 600 сек	60
6.	100 мВт/см^2 × 1200 сек	120

Для порівняння біологічних ефектів у культурі клітин, опромінених в експериментальній термостатованій камері, застосовували лазерне (монохроматичне) опромінення від апарата «Ліка хірург» (ЧМПП «Фотоніка плюс», м. Черкаси) (He-Ne-лазер) за потужності 100 мВт з експозицією 10 хв (щільність світлової енергії 60 Дж/см^2).

2.3 Опромінення клітин нейтронами спектру поділу (1,2 МеВ)

Опромінення клітин проводили на горизонтальному каналі для біологічних досліджень на атомному реакторі ВВР-М Інституту ядерних досліджень НАН України в спеціально сконструйованій термостатованій (37°С) камері із світлодіодами (630 нм) через 24 год після введення в поживне середовище з клітинами НЗА (молекулярних та нанокомпозитів) в концентраціях 5 та 50 мкг/мл. Після опромінення клітини пересаджувались у

скляні пляшечки з покривними скельцями на дні та культивувались впродовж 5 діб. Доза опромінення за розрахунками складала 1 Гр. Розрахунок дози проводили методом Монте Карло за допомогою програми MCNP4. Враховували елементний склад клітин, сенсибілізаторів (за винятком бора). У програму вводився середній потік нейтронів $P_{тн} = 10^8$ н/с /см^2.

2.4 Методи оцінки життєздатності клітин в культурі

Морфофункціональні характеристики культури клітин оцінювали за загальноприйнятими показниками життєздатності: мітотичної і проліферативної і активності та кількості гігантських багатоядерних клітин. За кінетикою росту оцінювали проліферативну активність клітин. Упродовж п’яти діб, щоденно, готували препарати: фіксували 96° етанолом та фарбували гематоксилін-еозином. На предметне скло препарати з пофарбованими клітинами наклеювали канадським бальзамом. Під оптичним мікроскопом «Axioscop» (West Germany) при збільшенні у 1000 разів у межах сітки методом випадкових полів по С. Б. Стефанову підраховували загальну кількість клітин, кількість мітозів і кількість гігантських багатоядерних (2 і більше ядер) клітин. Мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів розраховувався на 1000 клітин (‰). Фото отримані за допомогою цифрової камери DIGITAL CAMERA for Microscope ScienceLab DCM320(USB 2.0), Resolution 3.5 Mpixels.

2.5 Визначення кількості апоптотичних клітин у культурах

У тих же культурах клітин, в яких досліджували їх виживання та активність мітохондріальних ферментів, визначали рівень апоптозу. Для цього клітини, які залишились на дні флакона після відбору покривного скла, промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) (на 1 л дистильованої

води 14,4 мг $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$, 12 г KH_2PO_4, 40 г NaCl, 1г KCl, 1 г азиду Na), 10 хв витримували у розчині Версену для відкріплення їх від скла, потім заміщували його ЗФР, ресуспендували. 1 мл суспензії клітин центрифугували у ЗФР (1500 об/хв протягом 5 хв), супернатант зливали. Процедуру відмивання повторювали 3 рази. Потім до осаду у пробірку додавали 1 мл розчину пропідію йодиду (5 мг PI, 0,1 % цитрату Na та 0,1 % Triton X-100) та інкубували протягом 1 год при температурі 4°С. Аналізували клітини на протоковому цитофлюориметрі FACStar Plus фірми "Becton Dickinson" (США). Оцінювали червону флуоресценцію (канал FL – 2) пропідіум йодиду з довжиною хвилі λ 595 нм не менш, ніж для 10000 клітин [48].

За допомогою t-критерію Стьюдента проводили статистичний аналіз вірогідності отриманих даних [49], з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel та Biostat з перевіркою гіпотези про нормальний розподіл випадкової величини за критерієм Колмогорова – Смірнова.

Під час проведенні експериментальних досліджень проаналізовано 1894 препарати культур клітин.

РОЗДІЛ 3.
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Клітинні реакції за умов інкубації клітин з молекулярними НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями

3.1.1 Життєздатність клітин лінії L_{929} в умовах впливу НЗА 1-карба-*клозо*-додекарборат цезію. Результати експериментальних досліджень модифікуючого впливу реагента А в різних концентраціях на життєздатність клітин у тест-системі культури фібробластоподібних перманентно проліферуючих клітин лінії L_{929} представлені на рис. 3.1 (а–г) та 3.2. Аналіз морфологічної структури популяції клітин показав, що при інкубації клітин з реагентом А зміни показників носять дозозалежний характер.

За найменшої концентрації 0,05 мкг/мл (г) у полі зору спостерігалася значна кількість клітин полігональної форми, багато мітозів, рідко – полікаріоцити. Ядра клітин округлі з чіткими ядерцями, цитоплазма клітин, в основному, дифузна, у деяких – слабовакуолізована. При підвищенні концентрації реагента А на порядок – 0,5 мкг/мл (в) в культурі клітин індукувалося утворення значної кількості багатоядерних клітин, що може свідчити про зміну метаболізму в клітинах, направлену на активацію синтетичних процесів та наростання патології мітозу (утворення трьохядерних клітин). Культивування клітин з реагентом А в концентрації – 5 мкг/мл (б) призводило до зменшення щільності клітинного моношару, мітотичної активності клітин та істотного підвищення кількості полікаріоцитів з числом ядер в клітинах більше двох.

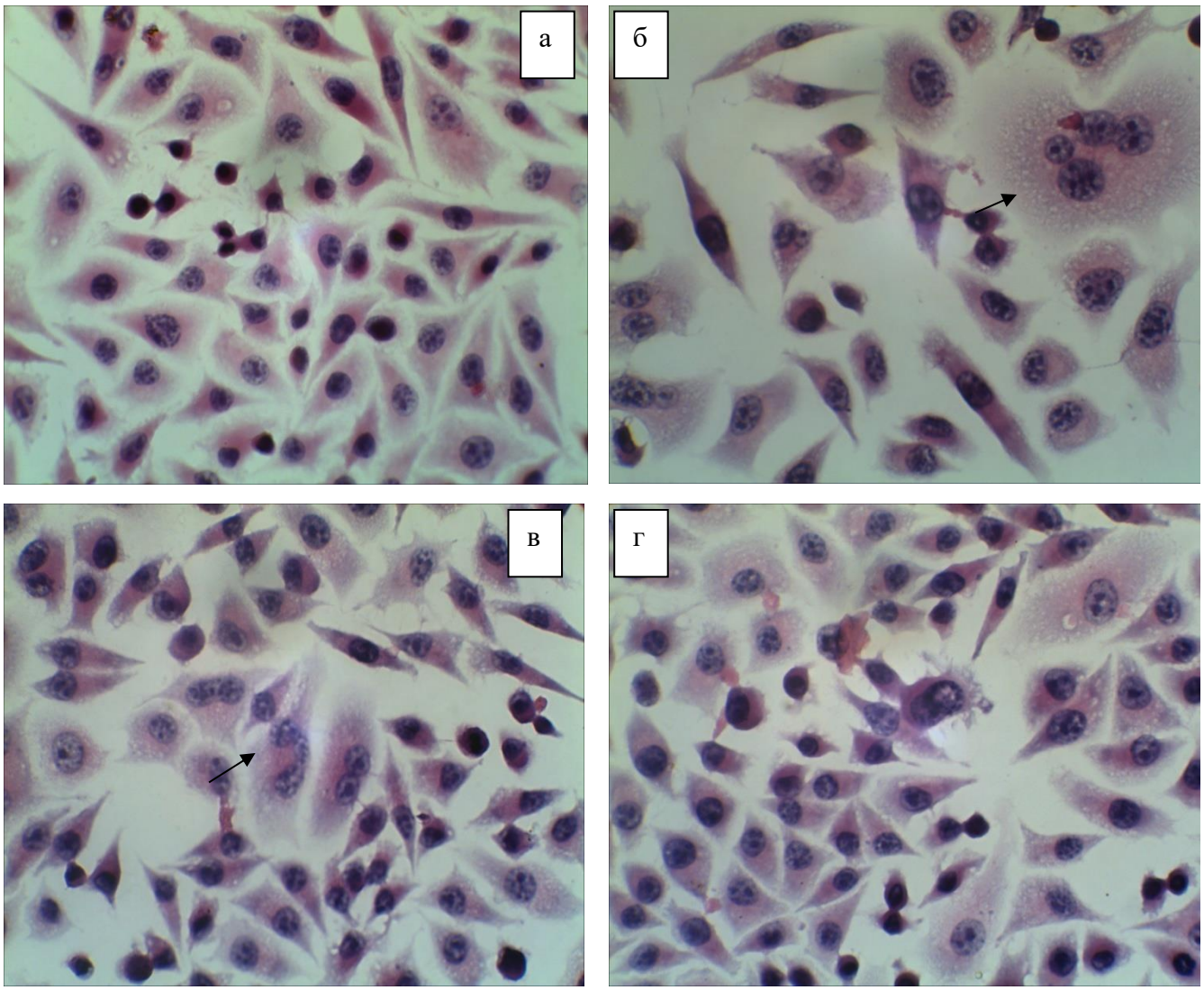

Рис. 3.1. Структура популяції клітин лінії L_{929} на 4-ту добу в інтактному контролі (а) та при спільному культивуванні з НЗА (реагент А) в концентраціях 5 мкг/мл (б), 0,5 мкг/мл (в) та 0,05 мкг/мл (г). Стрілками позначені гігантські багатоядерні клітини – полікаріоцити. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення × 400.

Інкубація клітин з реагентом А в концентрації 5 мкг/мл (рис. 3.4) зменшувала виживання клітин на 65 % у порівнянні з контролем, а застосування його в концентрації 0,05 мкг/мл не призводило до змін у виживанні клітин.

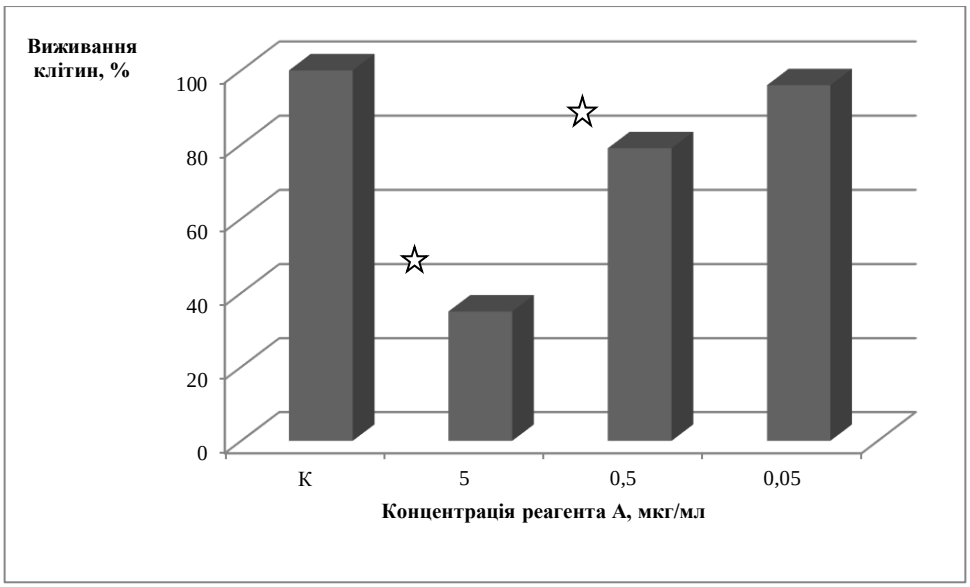

Рис. 3.2. Виживання клітин лінії L_{929} на 4-ту добу культивування з реагентом А в різних концентраціях.

Примітка: ☆ – відмінності достовірні у порівнянні з інтактним контролем, $p < 0,05$.

Слід відмітити досить високу мітотичну активність клітин в культурі за умов інкубації їх з НЗА у досліджуваних концентраціях, однак мітотичний індекс статистично достовірно нижчий, ніж в контролі (рис. 3.3).

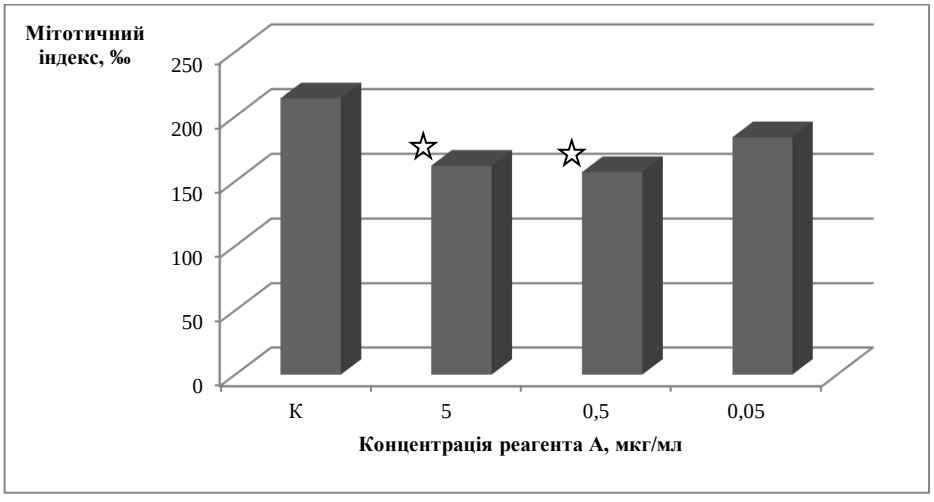

Рисунок 3.3. Мітотична активність клітин лінії L_{929} на 4-ту добу культивування з реагентом А в різних концентраціях.

Примітка: ☆ – відмінності достовірні у порівнянні з інтактним контролем, $p < 0,05$.

Водночас при усіх концентраціях НЗА статистично достовірно ($p < 0,05$) збільшувався кількість гігантських багатоядерних клітин (рис. 3.4): найбільшу кількість – 59 ‰ відмічали за концентрації реагента А 0,5 мкг/мл, що свідчило про значні метаболічні зрушення в популяції клітин, зокрема, синтетичних процесів, які на разі могли бути патологічними формами мітозу.

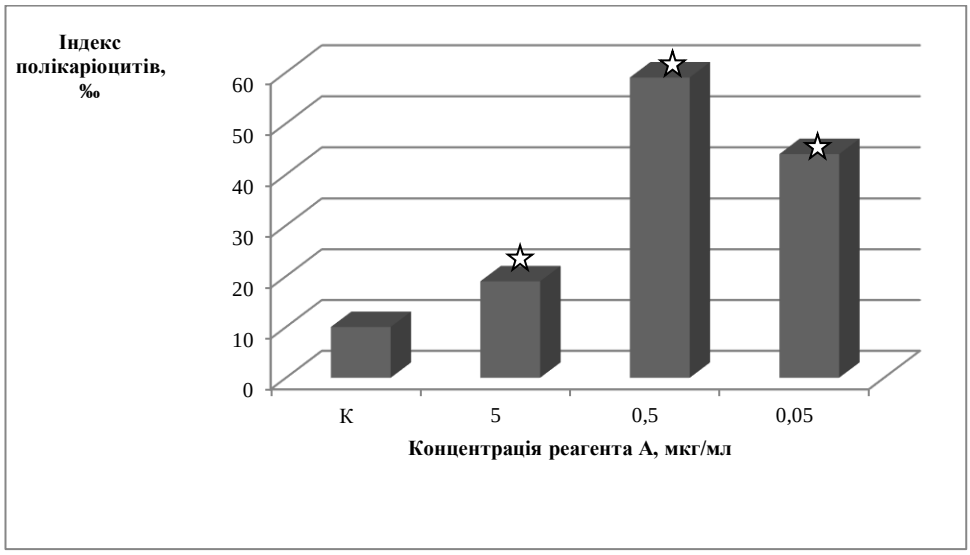

Рис. 3.4 – Залежність кількості багатоядерних клітин у культурі клітин лінії L_{929} на 4-ту добу культивування з реагентом А в різних концентраціях.

Примітка: ☆ – відмінності достовірні у порівнянні з інтактним контролем, $p < 0,05$.

Отже, інкубація фібробластоподібних клітин лінії L_{929} з НЗА 1-карба-*клозо*-додекарборатом цезію призводила до дозозалежного зменшення виживання клітин, їх мітотичної активності та наростання гетерогенності в культурі клітин – утворення полікаріоцитів з різною кількістю ядер в них.

3.1.2 Клітинні реакції в умовах впливу НЗА {5,10,15,20-тетракис[*п*-(1’-карба-*клозо*-додекарборан-1’-іл)тетрафторфеніл]-17,18-дигідропорфірин} натрію. Реагент Б відноситься до НЗА з досить високою молекулярною масою і складною стереохімічною будовою. Інкубація клітин лінії L_{929} з

досліджуваним реагентом призводила до зменшення щільності клітинного моношару та зміни морфологічної структури клітинної популяції (рис. 3.5).

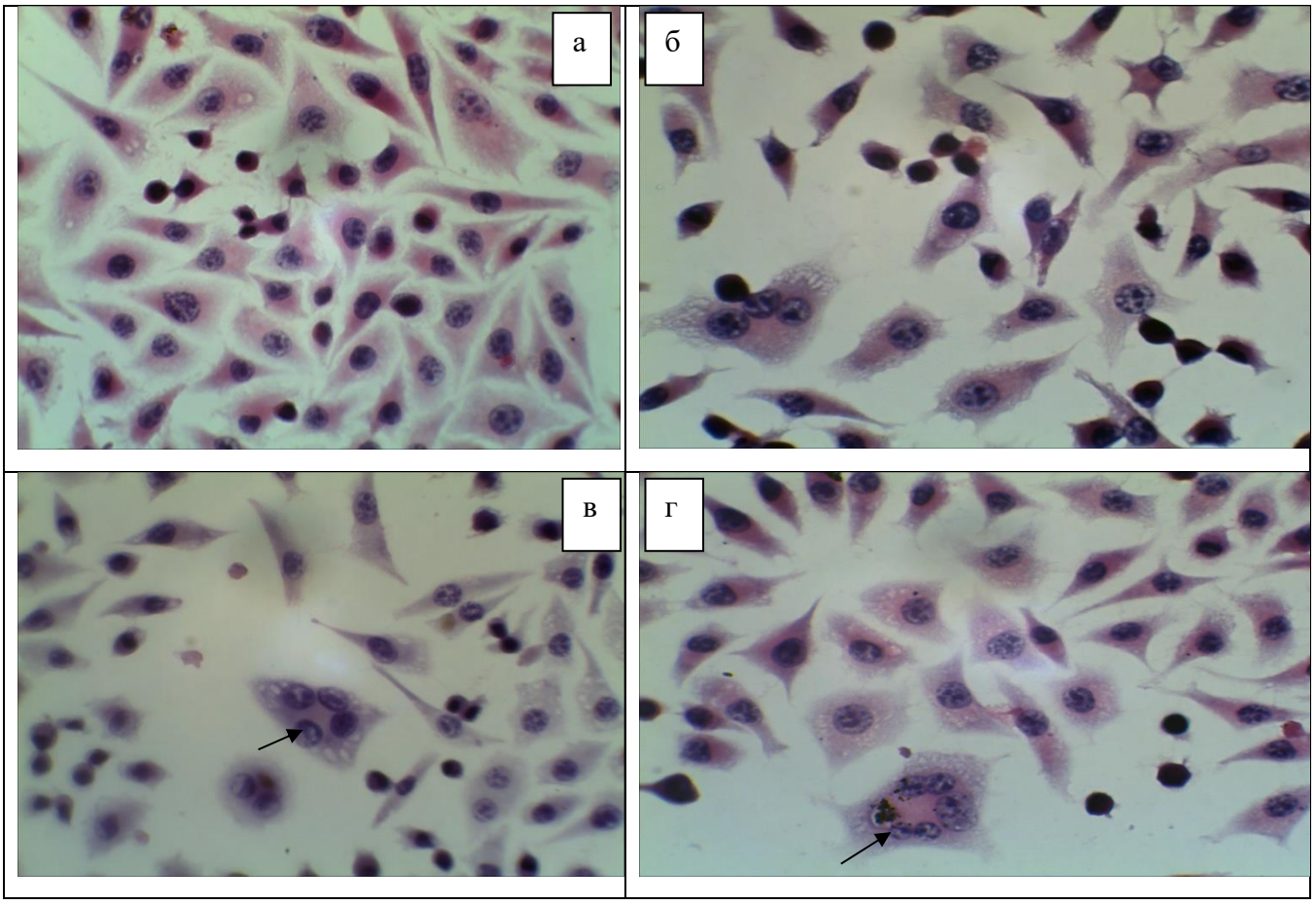

Рис. 3.5. Структура популяції клітин лінії L_{929} на 4-ту добу в контролі (а) та при спільному культивуванні з НЗА (реагент Б) в концентраціях 5 мкг/мл (б), 0,5 мкг/мл (в) та 0,05 мкг/мл (г). Стрілками позначені гігантські багатоядерні клітини – полікаріоцити. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення × 400.

Клітини набували полігональної форми, відмічалося набухання та вакуолізація цитоплазми, спостерігали значну кількість гігантських форм багатоядерних клітин. У полі зору при концентраціях 0,05 та 0,5 мкг/мл спостерігали значну кількість мітозів.

Аналіз життєздатності клітин за цих умов показав, що їх виживання зменшувалося до 60 % у порівнянні з інтактними культурами (рис. 3.6) та не залежало від концентрації реагента Б.

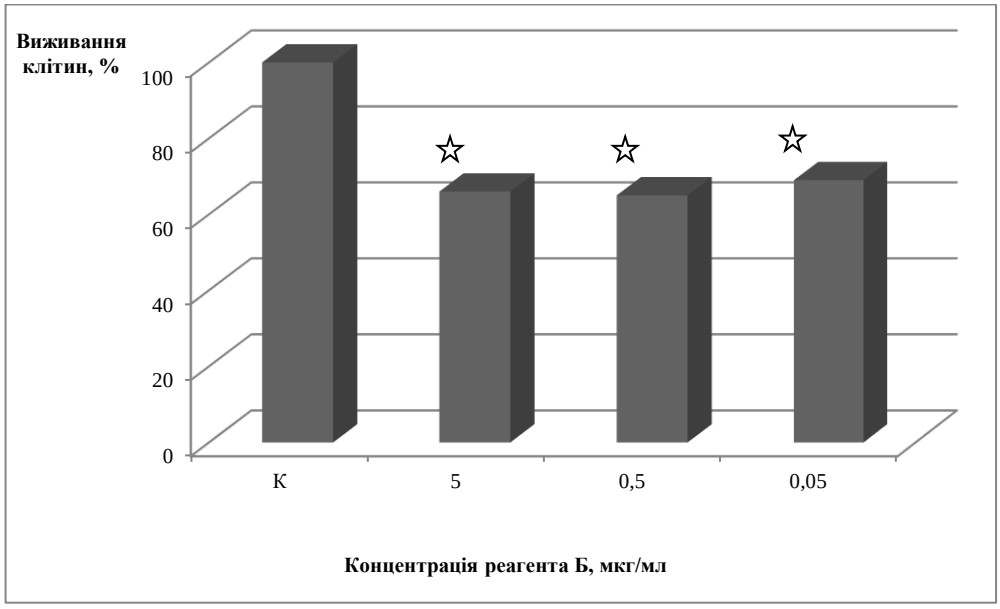

Рис. 3.6. Виживання клітин лінії L_{929} на 4-ту добу культивування з реагентом Б в різних концентраціях.

Примітка. ☆ – відмінності достовірні у порівнянні з інтактним контролем, $p < 0,05$.

Мітотична активність клітин (рис. 3.7) при їх інкубації з реагентом Б в концентрації 0,05 мкг/мл зростала в 1,4 разу, а за концентрації 5 мкг/мл – зменшувалася в 1,5 разу. Підвищення мітотичної активності клітин на тлі зменшення їх виживання за умови інкубації клітин з реагентом Б в найменшій досліджуваній концентрації 0,05 мкг/мл свідчило про динамічну рівновагу двох процесів, які відбувалися в тест-системі культури клітин: загибель та проліферація. На разі однією з форм репродуктивної загибелі клітин лінії L_{929} є утворення гігантських багатоядерних клітин за рахунок патологічних мітозів. Отже, індекс гігантських полікаріоцитів зростав майже в 4 рази за усіх досліджуваних концентрацій НЗА (рис. 3.8).

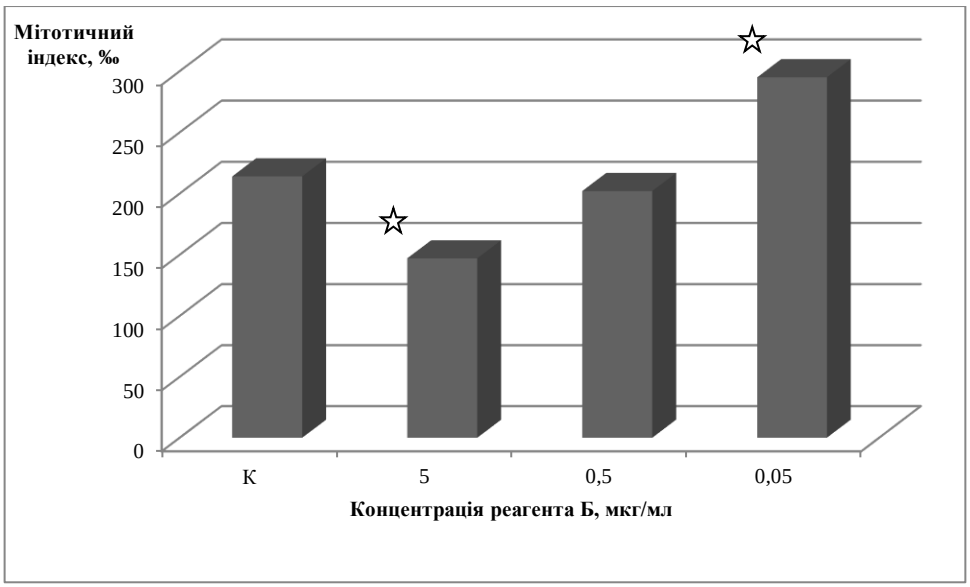

Рис. 3.7. Мітотична активність клітин лінії L_{929} на 4-ту добу культивування з реагентом А в різних концентраціях.

Примітка: ☆ – відмінності достовірні у порівнянні з інтактним контролем, $p < 0,05$.

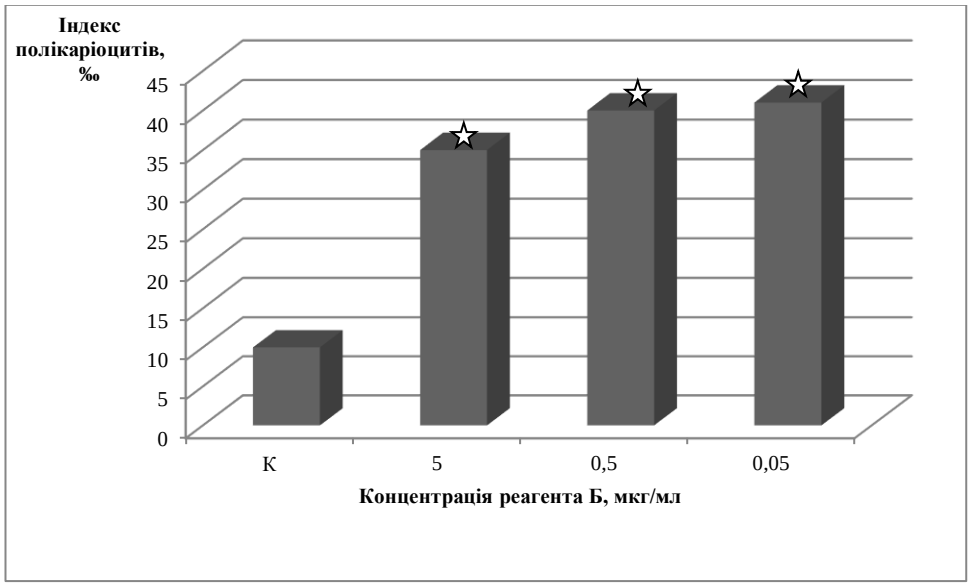

Рис. 3.8. Залежність кількості багатоядерних клітин у культурі клітин лінії L_{929} на 4-ту добу культивування з реагентом А в різних концентраціях.

Примітка: ☆ – відмінності достовірні у порівнянні з інтактним контролем, $p < 0,05$.

Таким чином, за результатами експериментальних досліджень біологічна ефективність НЗА {5,10,15,20-тетракис[*n*-(1’-карба-*клозо*-додекарборан-1’-іл)тетра-фторфеніл]-17,18-дигідропорфірин} натрію відрізнялася від біологічної ефективності НЗА 1-карба-*клозо*-додекарбората цезію за показниками виживання клітин (%) та здатністю до утворення гігантських полікаріоцитів. На нашу думку мають місце різні механізми взаємодії досліджуваних НЗА з клітинами (прямі чи опосередковані).

3.2 Біологічні ефекти в культурі клітин при дії нанорозмірних магнітокерованих нейтронозахватних агентів

3.2.1 Клітинні реакції при дії магнітокерованих нанорозмірних композитів з бором та гадолінієм. В наступній серії експериментальних досліджень вивчали морфофункціональні показники клітин лінії L_{929} при інкубації з НЗА, які є наночастинками фериту Fe_3O_4 . Слід зазначити, що для надання магніточутливим нанокомпозитам – реагентам 4 і 6 високої біосумісності їх поверхню модифікували γ-амінопропілтриетоксисиланом (γ-АПС) та діетилентриамінпентаоцтовою кислотою (ДТПК) або *мезо*-2,3-димеркаптосукциновою кислотою (ДМСК). Передбачається, що така модифікація полегшує проникнення їх усередину клітин шляхом ендоцитозу, а також знижує реакційну здатність поверхні наночастинок, що може проявлятись у низькій цитотоксичності. Реагент **7** – НЗА на основі наночастинок фериту стабілізували олеатом натрію. Всі НЗА містили атоми гадолінію-157 або гадолінію-157 та бору-10.

Дослідження показали, що інкубація клітин з реагентом **2** (нанокомпозит фериту з гадолінієм) в діапазоні концентрацій 0,05 – 500 мкг/мл (рис. 3.9, а–е) не мала токсичного впливу: клітини утворюють щільний моношар, форма клітин веретеновидна та полігональна, цитоплазма –слабовакуолізована за низьких концентрацій, вакуолізована – при дії 50 та

500 мкг/мл. Спостерігалися апоптотичні клітини. Деякі клітини містили включення, які можливо є наночастинками.

Виживання клітин статистично достовірно ($p \leq 0,05$) не відрізнялося від показників контролю (рис. 3.9, е). Особливістю впливу досліджуваного НЗА було підвищення мітотичної активності в культурі клітин та збільшення кількості багатоядерних клітин за концентрації 50 мкг/мл.

Інкубація клітин з НЗА – реагентом 3 (нанокомпозит з гадолінієм та бором) в концентраціях 0,05 – 5 мкг/мл також не призводила до токсичних проявів з боку культури клітин (рис. 3.10, а–е). Водночас за концентрацій 0,5 та 5 мкг/мл відмічали активізацію мітотичної активності.

При культивуванні з НЗА в концентраціях 50 та 500 мкг/мл на препаратах спостерігали наночастинки як в міжклітинному просторі, так і всередині клітин: в цитоплазмі та в ядрі. Привертають увагу істотні деструктивні зрушення при дії реагенту 3 в концентрації 500 мкг/мл: клітини дуже збільшені, цитоплазма – сильновакуолізована, еозинофільна, ядра – рихлі, зернисті, присутні апоптотичні та некробіотичні клітини. Мітотичних клітин дуже мало.

Нанокомпозит, синтезований на основі фериту та модифікований γ-АПС та ДТПК (реагент 4), дійсно став більш біосумісним, ніж ті НЗА, що містять тільки бор та гадоліній. При інкубації клітин з реагентом 4 не встановили статистично достовірних змін проліферативної та мітотичної активності в культурі клітин лінії L_{929} (рис. 3.11, а–е). Морфологічно структура клітинної культури була подібна до контролю: веретено видні та полігональні клітини з центрально розміщеними ядрами. Цитоплазма клітин мала сітчасту структуру. В міжклітинному просторі і в цитоплазмі деяких клітин помітно багато дрібних часток, які, ймовірно, є наночастинками. За найменшої концентрації спостерігали підищену у 1,5 раза кількість полікаріоцитів. Зустрічались апоптотичні клітини.

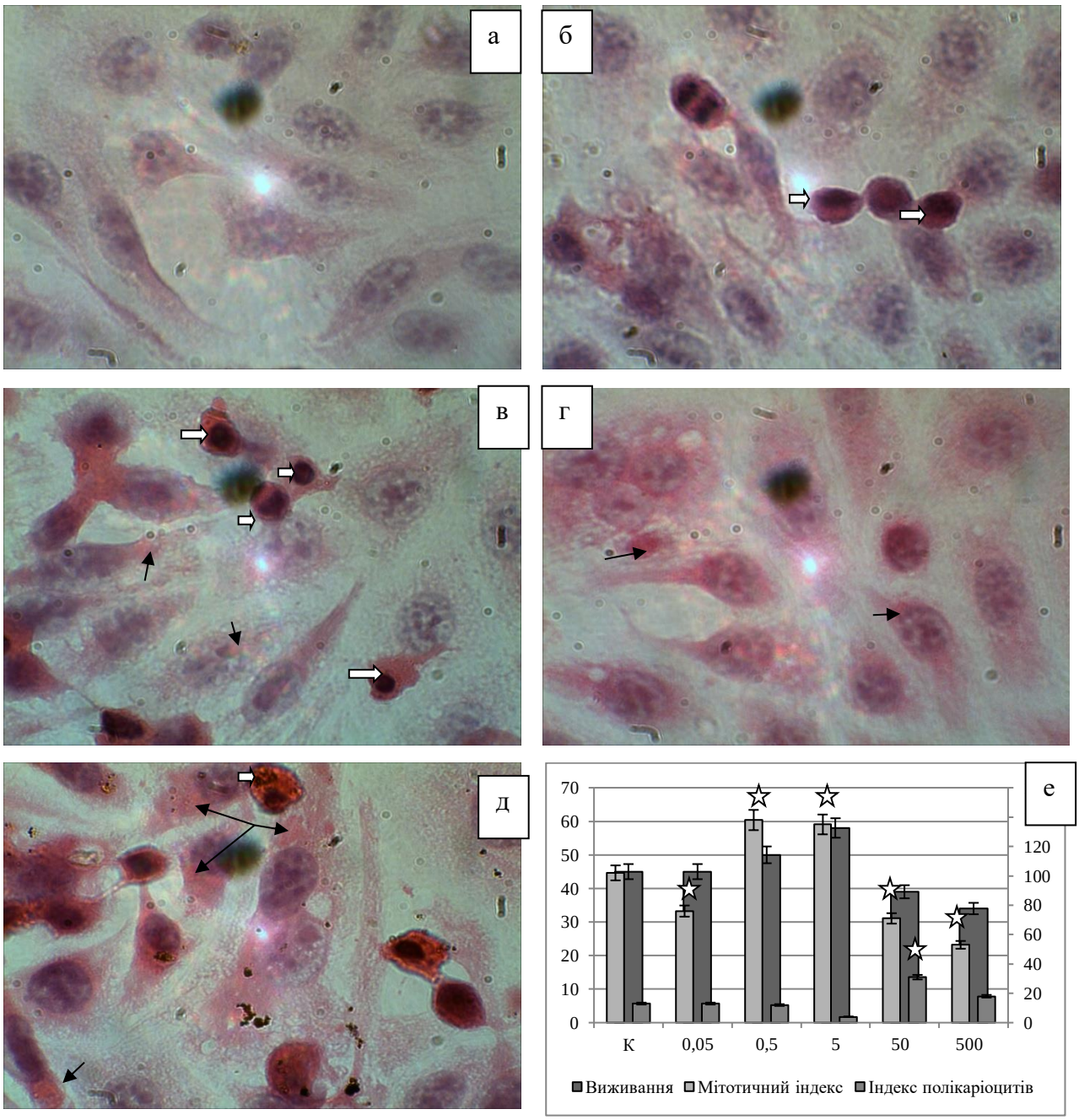

Рис. 3.9. Морфофункціональні зміни в культурі клітин лінії L_{929} на 5-ту добу в присутності НЗА (реагент 2) в концентраціях 0,05 мкг/мл (а), 0,5 мкг/мл (б), 5 мкг/мл (в) 50 мкг/мл (г) та 500 мкг/мл (д). Білими стрілками позначені апоптотичні клітини, чорними – включення нанокомпозиту. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення × 1000. Залежність показників життєздатності від концентрації реагента 5 (е). На основній осі ординат – кількість клітин на площі препарату 0,05 мм^2 (виживання), на додатковій осі ординат – мітотичний індекс, ‰ та індекс полікаріоцитів, ‰. На осі абсцис– концентрація НЗА, мкг/мл.

Примітка: ☆ – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

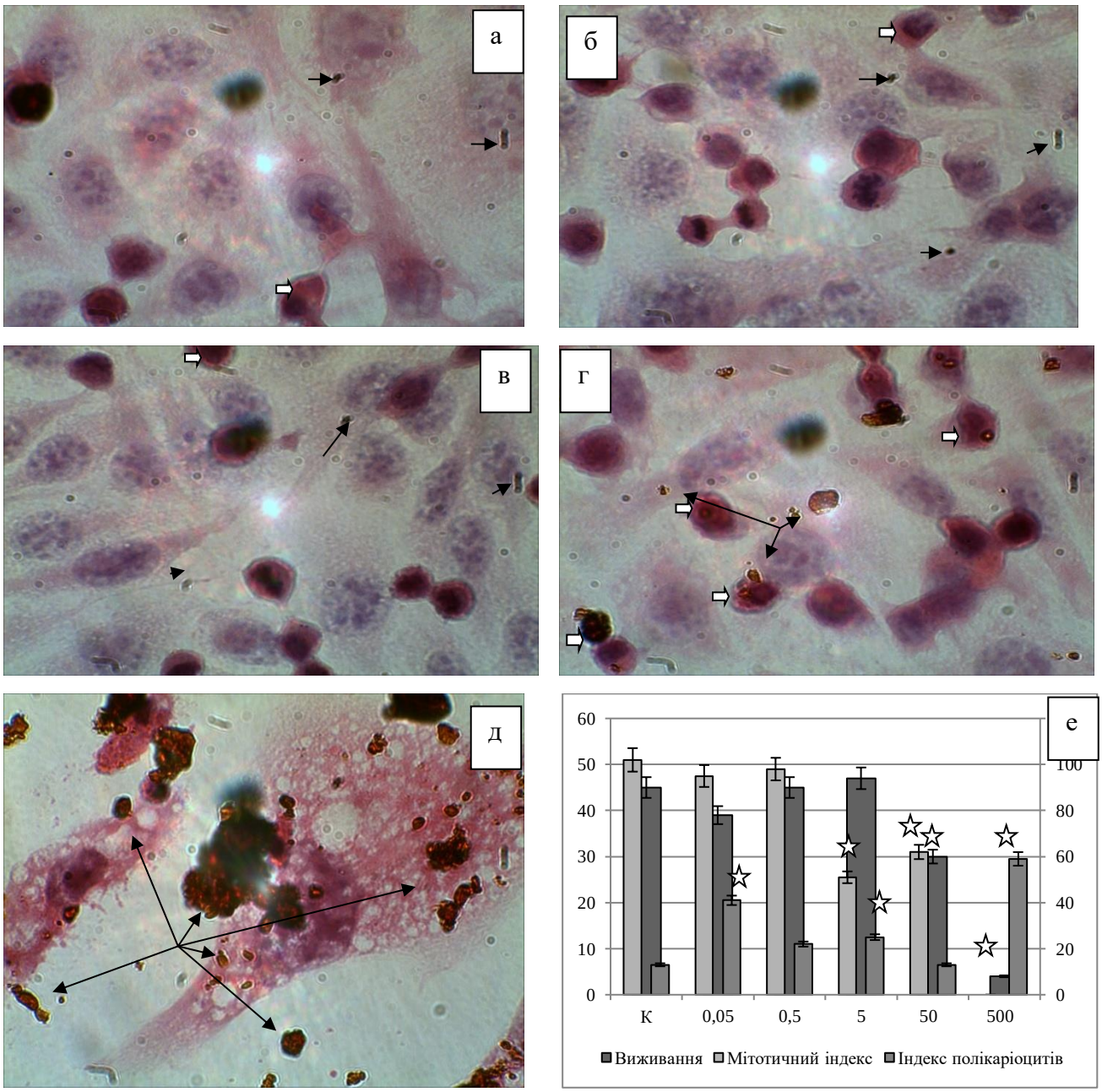

Рис. 3.10. Зміна структурних та морфофункціональних характеристик культури клітин лінії L_{929} на 5-ту добу в присутності НЗА (реагент 3) в концентраціях 0,05 мкг/мл (а), 0,5 мкг/мл (б), 5 мкг/мл (в) 50 мкг/мл (г) та 500 мкг/мл (д). Білими стрілками позначені апоптотичні клітини, чорними – наночастинки. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення × 1000. Залежність показників життєздатності від концентрації реагента 5 (е). На основній осі ординат – кількість клітин на площі препарату 0,05 мм^2

(виживання), на додатковій осі ординат – мітотичний індекс, ‰ та індекс полікаріоцитів, ‰. На осі абсцис – концентрація НЗА, мкг/мл.

Примітка: ☆ – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Культивування клітин в присутності реагента **6** (гадолінійвмісний ферит, модифікований ДМСК) теж не викликало істотних деструктивних змін в культурі (рис. 3.12, а–е). Спостерігали велику кількість клітин на різних стадіях поділу та рівномірний моношар клітин. Помітно, що полікаріоцити мали 4–6 і більше ядер, проти 2–3 – у контролі. При всіх концентраціях відмітили деяке підвищення кількості клітин на площі препарата за рахунок ослаблення адгезивних властивостей клітин. Водночас інкубація клітин з реагентом 6 в дозах 0,5 та 5 мкг/мл призвела до підвищення кількості гігантських багатоядерних клітин, що видно на рис. 3.12, б та г.

Значні зміни в культурах клітин викликала магнітна речовина, модифікована олеатом натрію (рис. 3.13, а–е), особливо за концентрації 500 мкг/мл: спостерігали деградацію відсутність мітозів, клітинного моношару, та полікаріоцитів. За менших концентрацій спостерігали зміну форми клітин: з’явились округлі та овальні клітини, змінилось ядерно-цитоплазматичне співвідношення: зменшився об’єм цитоплазми. На разі слід відмітити, що зменшення мітотичного індексу у 2–5 разів спостерігали за концентрацій 0,05–50 мкг/мл. Попадання нанокомпозиту в клітину інгібує поділ клітин та, ймовірно, індукує апоптоз.

Виходячи з цього, аналіз морфофункціональних характеристик клітин в культурі за умов впливу молекулярних (реагенти А та Б) та магнітокерованих нанокомпозитів з різною структурою (реагенти 1-7) нейтронозахватних агентів з фотосенсибілізуючими властивостями в широкому діапазоні концентрацій показав, що всі досліджувані субстанції, попадаючи в клітину, в більшій чи в меншій мірі змінюють певні характеристики культури клітин: викликають інтерфазну чи репродуктивну загибель клітин, індукують

утворення атипових клітин,підвищують або пригнічують мітотичну активність, послаблюють адгезивні властивості клітин.

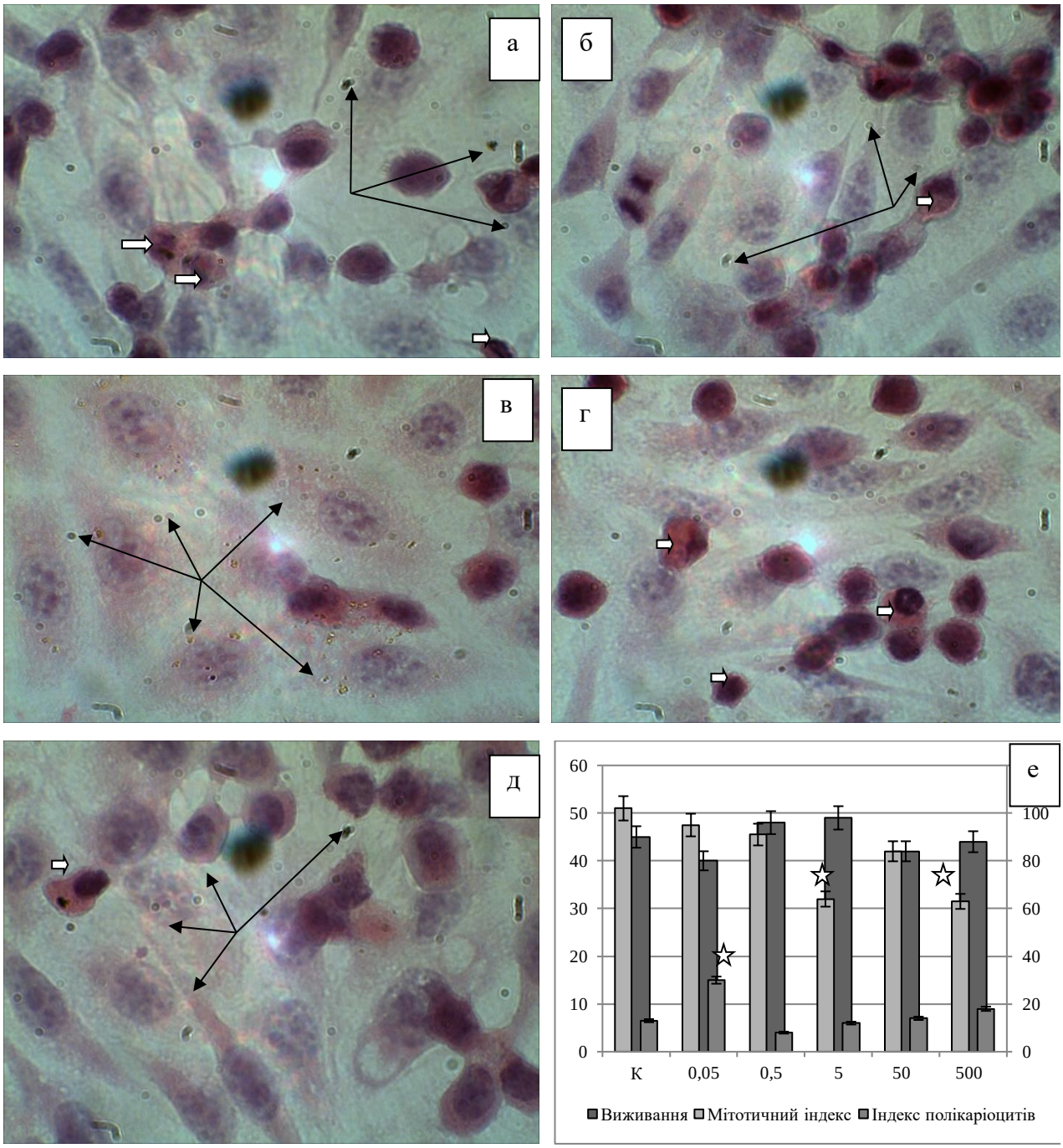

Рис. 3.11. Структурні та морфофункціональні зміни в культурі клітин лінії L_{929} при інкубації з НЗА (реагент 4) в концентраціях 0,05 мкг/мл (а), 0,5 мкг/мл (б), 5 мкг/мл (в) 50 мкг/мл (г) та 500 мкг/мл (д) на 5-ту добу культивування. Білими стрілками позначені апоптотичні клітини, чорними –

частинки НЗА. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення × 1000. Залежність показників життєздатності від концентрації реагента 5 (е).

Примітка: ☆ – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

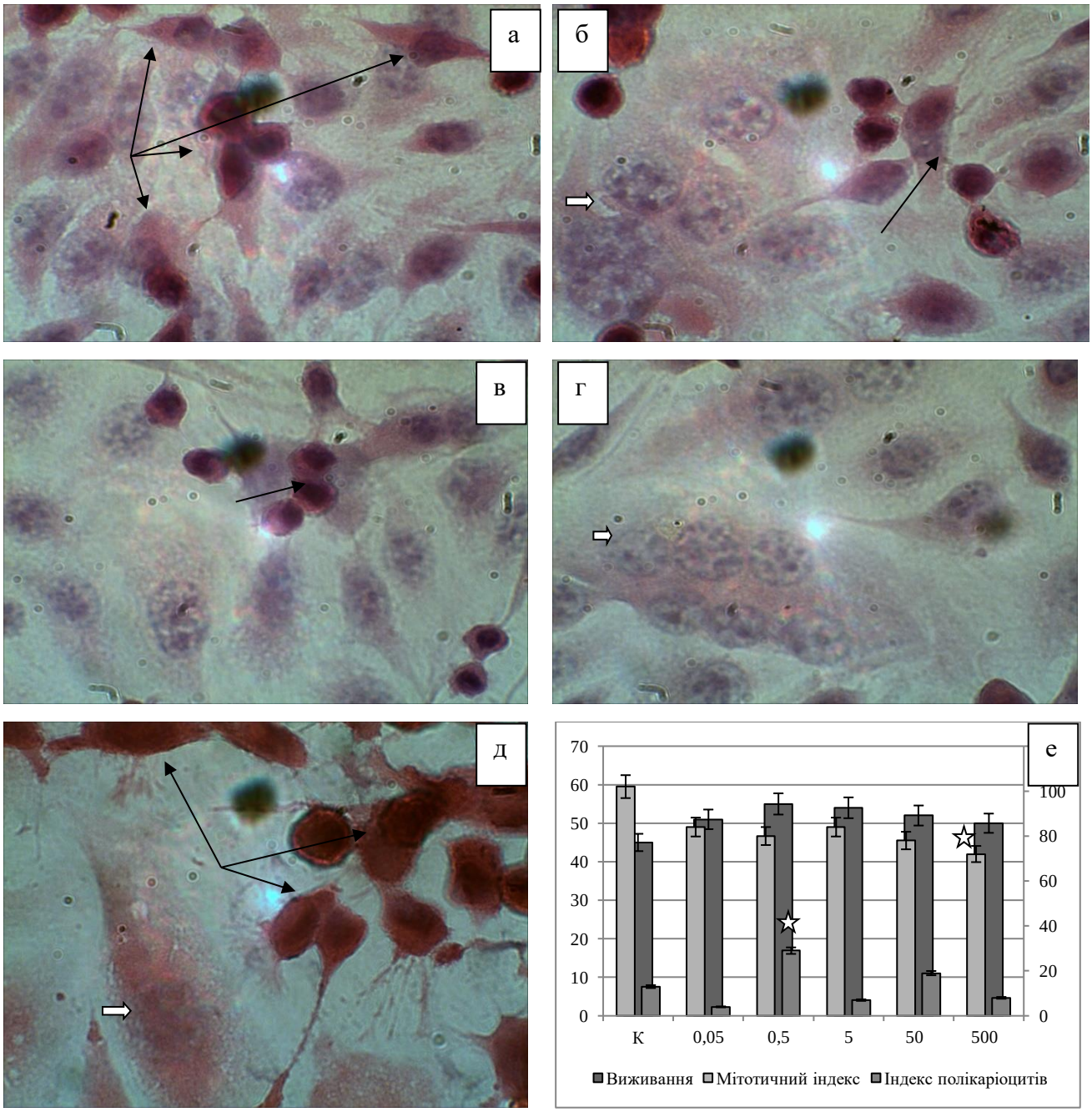

Рис. 3.12. Структурні та морфофункціональні зміни в культурі клітин лінії L_{929} на 5-ту добу при інкубації з НЗА (реагент **6**) в концентраціях 0,05 мкг/мл (а), 0,5 мкг/мл (б), 5 мкг/мл (в) 50 мкг/мл (г) та 500 мкг/мл (д). Білими стрілками позначені полікаріоцити, чорними – нашарування клітин з меншою адгезивною здатністю. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення × 1000.

Примітка: ☆ – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

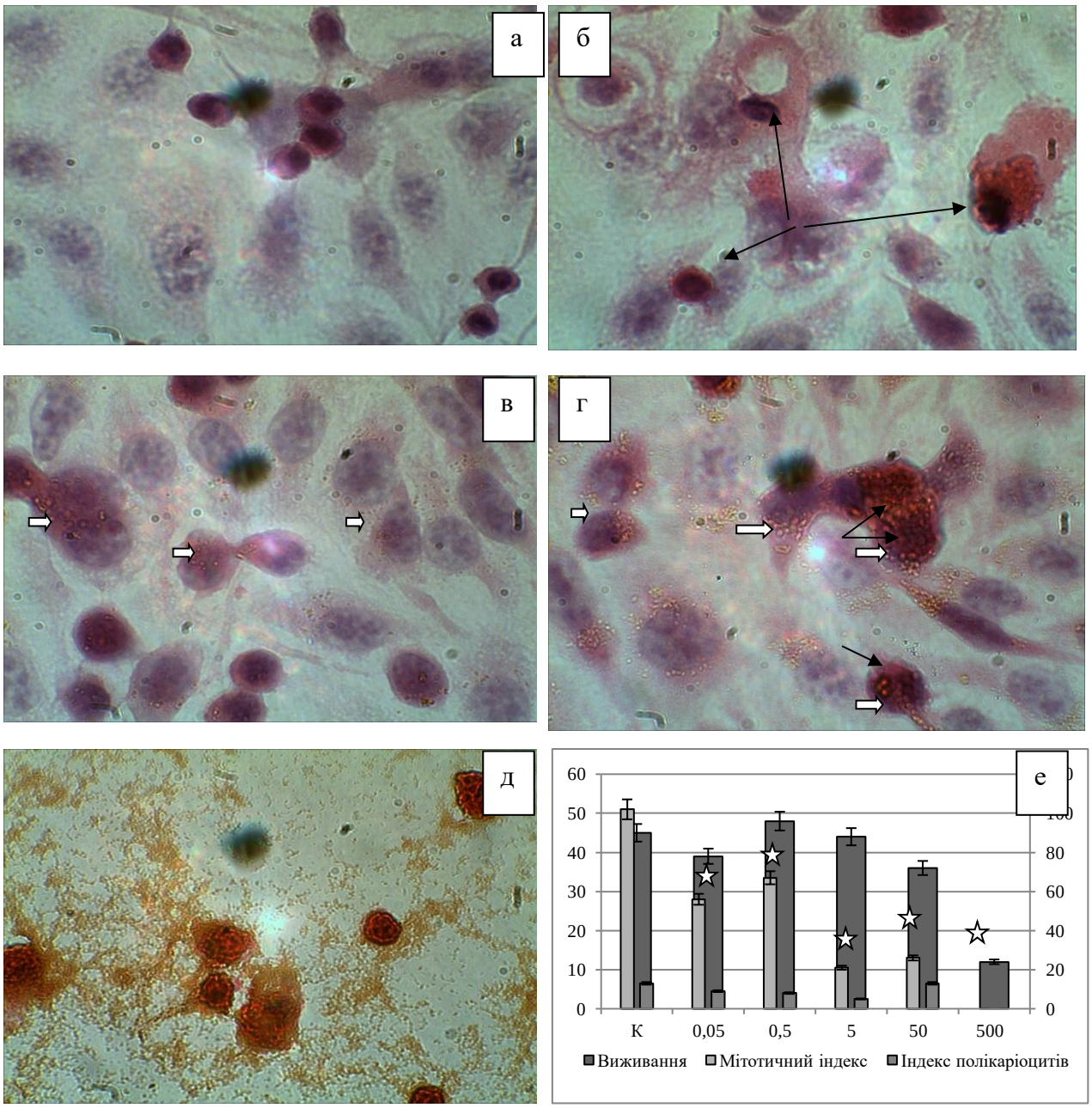

Рис. 3.13. Структурні та морфофункціональні зміни в культурі клітин лінії L_{929} на 5-ту добу культивування в присутності НЗА (реагент **7**) в концентраціях 0,05 мкг/мл (а), 0,5 мкг/мл (б), 5 мкг/мл (в) 50 мкг/мл (г) та 500 мкг/мл (д). Білими стрілками показано розміження НЗА в клітинах, чорними – апоптотичні клітини. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення × 1000. Концентраційна залежність (е) морфофункціональних характеристик культури клітин лінії L_{929} на 5-ту добу в контролі (К) та при інкубації з НЗА (реагент 7).

Примітка: ☆– відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

У зв’язку з особливими, недостатньо дослідженими, біологічними ефектами, які викликають НЗА із наноструктурою, не встановлені концентрациії які на 10, 50 чи 90 відсотків змінюють показники життєздатності клітин. Можна лише сказати, що в діапазоні концентрацій 0,005–5 мкг/мл ці реагенти спричиняють найменший ушкоджуючий ефект, а за концентрацій 50 та 500 мкг/мл вони викликають деструктивно-дегенераційні зміти в клітинах *in vitro*. Отже, для виконання завдань, які планувались на наступному етапі виконання НДР із застосуванням фотодинамічної терапії будуть використовуватись концентрації досліджуваних реагентів, які знаходяться в діапазоні 0,005–5 мкг/мл.

3.3 Біологічні ефекти у тест-системі культури клітин лінії L_{929} в умовах впливу червоного світла

3.3.1 Вплив червоного світла від експериментальної установки на світлодіодах на морфофункціональні властивості клітин. Експериментальне дослідження впливу видимого світла червоного діапазону в різних дозах на клітини *in vitro* дозволило встановити наскільки важливо враховувати фізичні характеристики опромінення для отримання певного біологічного ефекту. На рис. 3.14 показані зміни показників життєздатності клітин лінії L_{929} в залежності від дози червоного світла світлодіодів, а точніше від щільності потужності випромінювання та експозиції: за низьких доз (малих потужностей) (див. табл. 3.1) спостерігали зменшення виживання клітин у культурі більш, ніж на 20 %. Підвищення потужності випромінювання до 50 мВт/см^2 незалежно від експозиції призвело до активації проліферації на 20% порівняно з контролем. Водночас за меншої потужності випромінювання зросла кількість атипових багатоядерних клітин.

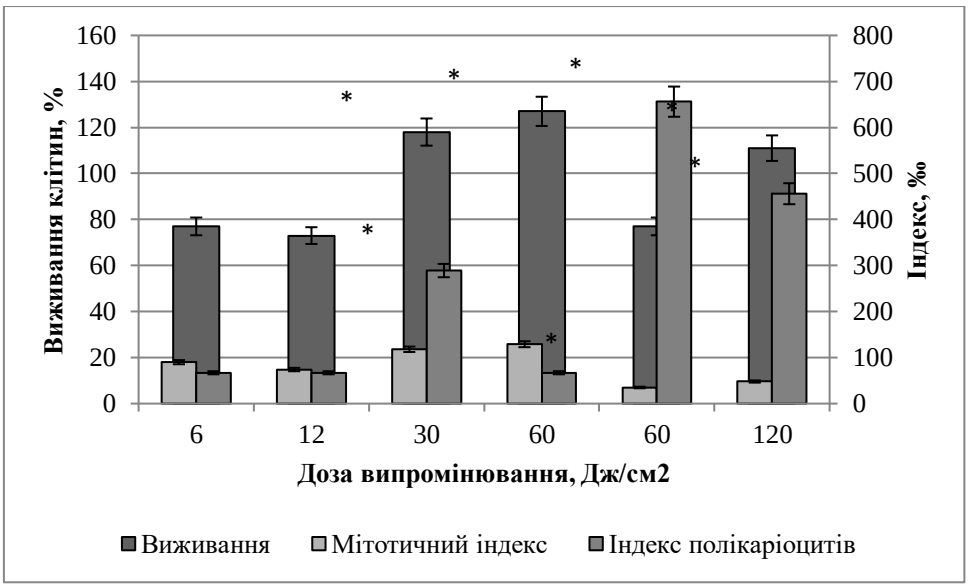

Рисунок 3.14. Дозова залежність показників життєздатності (виживання, % від контролю, мітотичний індекс, ‰, індекс полікаріоцитів, ‰) культури клітин лінії L_{929} на 5-ту добу після опромінення червоним світлом світлодіодів експериментальної термостатованої камери.

Примітка. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Привертає увагу різна ефективність дії червоного світла за однакових доз – 60 Дж/см^2, але різних експозицій (50 мВт/см^2 за 20 хв та 100 мВт/см^2 за 60 хв). В останньому варіанті виживання клітин зменшилось на 20 % відносно контролю, але збільшилось на 20 % порівняно з опроміненням у варіанті 50 мВт/см^2 за 20 хв. На таку різну біологічну ефективність червоного світла за різних умов його реалізації привертається увага у праці [49, 55]. Автори попереджують про те, що в залежності від питомої потужності випромінювання та його тривалості ефект впливу червоного світла може бути протилежним. Наприклад, при опроміненні в дозі 1 Дж/см^2 за умов 1 мВт з експозицією 1000 сек біологічний ефект буде позитивним, а за умов 100 мВт з експозицією 10 сек можна очікувати негативних проявів (рис. 3.15).

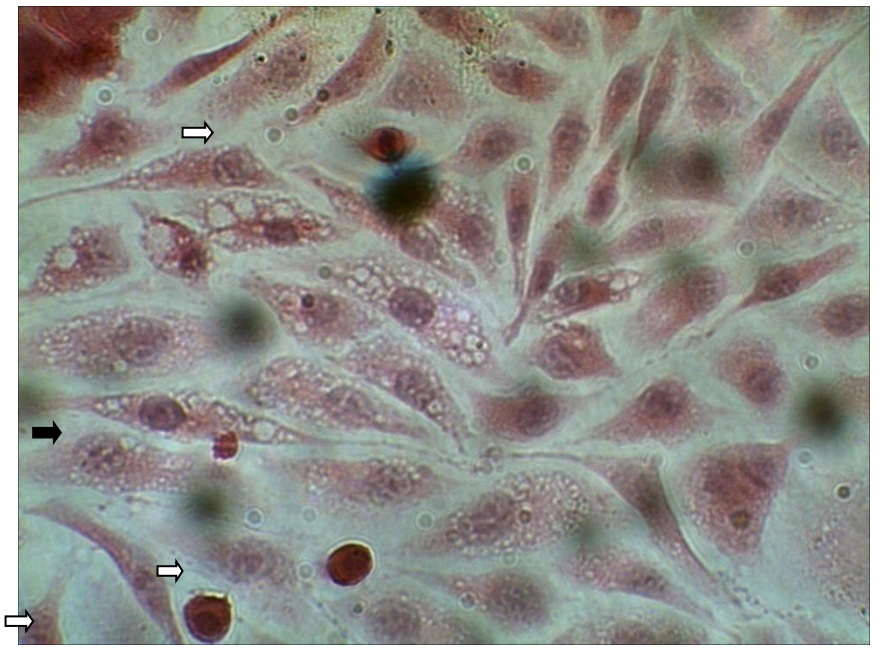

Рис. 3.15. Культура клітин лінії L_{929} на 5-ту добу культивування при опроміненні червоним світлом за умов: питома потужність випромінювання 100 мВт/см^2, експозиція 10 хв (доза опромінення 60 Дж/см^2). Клітини переважно полігональної форми, подекуди веретеноподібної форми. Цитоплазма клітин дрібнозерниста, щільна, в деяких клітинах – сильно вакуолізована. Ядра клітин округло-овальні, зміщене відносно центру клітин з чітко вираженими ядерцями. У полі зору декілька мітотичних та апоптотична клітини. Білими стрілками позначені мітози, чорною – апоптоз. Забарвлення гематоксиліном-еозином, збільшення × 400.

3.3.2 Життєздатність клітин лінії L_{929} в умовах поєднаного впливу НЗА з молекулярною структурою1-карба-*клозо*-додекарборат цезію та червоного світла. Результати експериментальних досліджень поєднаного впливу 1-карба-*клозо*-додекарбората цезію (реагента А) в різних концентраціях та червоного світла в дозі 60 Дж/см^2 на життєздатність клітин у тест-системі культури фібробластоподібних перманентно проліферуючих клітин лінії L_{929} представлені на рис. 3.16 та 3.17. Аналіз показав, що щільність клітинної популяції та мітотична активність клітин статистично достовірно зменшується (більш, ніж у 2 рази) вже за концентрації карборана

0,05 мкг/мл. Деструктивні зміни в популяції клітин спостерігалися за концентрацій НЗА 50 та 500 мкг/мл.

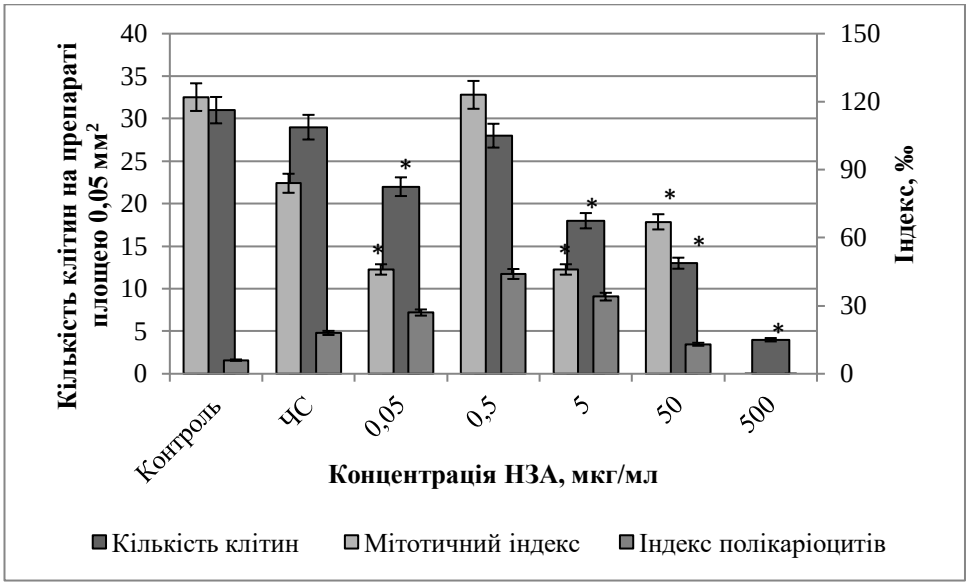

Рис. 3.16. Показники життєздатності (щільність клітинної популяції, мітотичний індекс, ‰, індекс полікаріоцитів, ‰) культури проліферуючих клітин лінії L_{929} (фаза логарифмічного росту) на 5-ту добу після їх інкубації з борвмісним нейтронозахватним агентом з молекулярною структурою (реагентом А) та опроміненням червоним світлом світлодіодів експериментальної термостатованої камери в дозі 60 Дж/см^2 (питома потужність дози 100 мВт/см^2, експозиція 10 хв).

Примітка. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Порівняння біологічних ефектів у культурі проліферуючих клітин лінії L_{929}, опромінених червоним світлом в дозі 60 Дж/см^2 (питома потужність дози 100 мВт/см^2, експозиція 10 хв) світлодіодів та He-Ne-лазера у поєднанні з борвмісним нейтронозахватним агентом з молекулярною структурою (1-карба-*клозо*-додекарборат цезію) (рис. 3.17) показало, що дія монохроматичного лазерного випромінювання спричиняє більші пошкодження в клітинах, ніж дія розсіяного світлодіодного випромінювання.

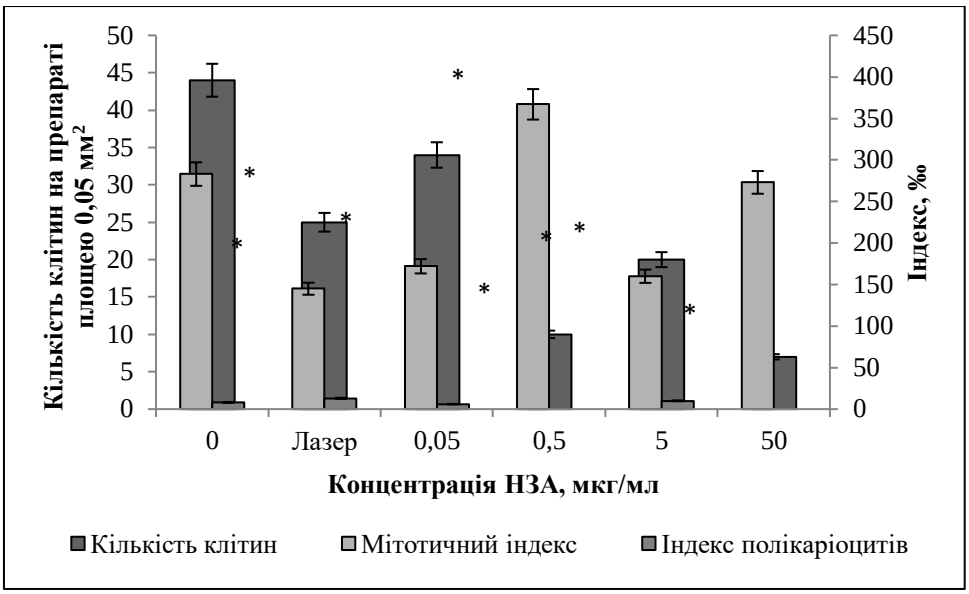

Рис. 3.17. Морфофункціональні зміни (виживання, %, мітотичний індекс, ‰, індекс полікаріоцитів, ‰) у культурі клітин лінії L_{929} за умов інкубації з борвмісним нейтронозахватним агентом з молекулярною структурою (1-карба-*клозо*-додекарборат цезію) у різних концентраціях та опромінювали червоним світлом He-Ne-лазера у дозі 60 Дж/см^2 (питома потужність дози 100мВт/см^2, експозиція 10 хв).

Примітка. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Інші ефекти були отримані у тест-системі культурі клітин у стаціонарній фазі росту (рис. 3.18), коли клітини інкубували з реагентом А та опромінювали червоним світлом на 5-ту добу культивування. Отримані результати досліджень засвідчили, що вплив червоного світла малоефективний: за досліджуваних концентрацій реагента А щільність клітинної популяції статистично достовірно не відрізняється від контролю, окрім високої концентрації, яка є високотоксичною. Проте слід відмітити, що за цих умов в культурі клітин різко зменшується мітотична активність, що може вказувати на контактне інгібування клітинного поділу, або на його пригнічення.

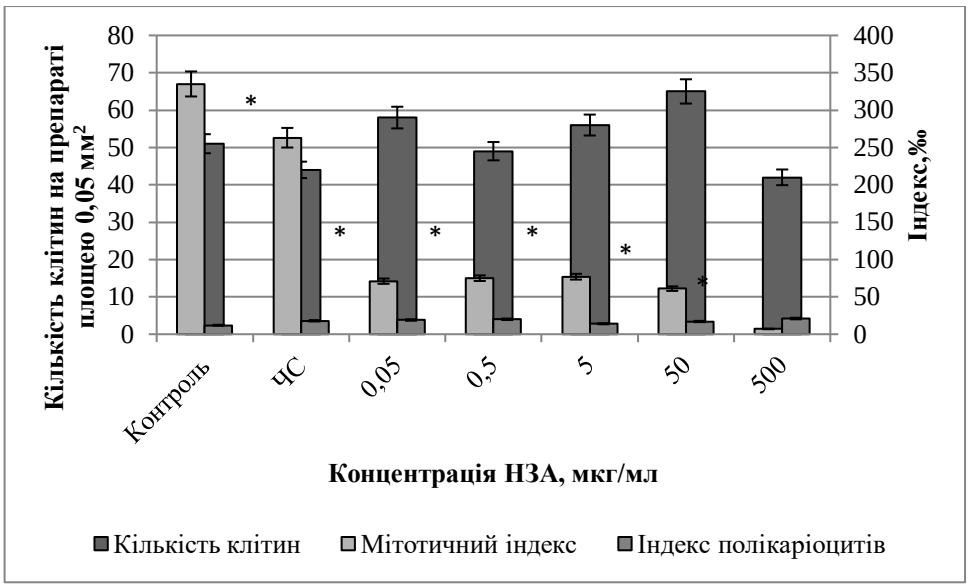

Рис. 3.18. Показники життєздатності (щільність клітинної популяції, мітотичний індекс, ‰, індекс полікаріоцитів, ‰) культури клітин лінії L_{929}, до якої на 5-ту добу (у фазі стаціонарного росту) добавали реагент А та опромінювали червоним світлом світлодіодів експериментальної термостатованої камери в дозі 60 Дж/см^2 (питома потужність дози 100 мВт/см^2, експозиція 10 хв).

Примітка. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Аналіз морфологічної структури популяції клітин показав (рис. 3.19), що після опромінення культури проліферуючих клітин червоним світлом в присутності реагента А зміни в структурі популяції клітин залежать від концентрації карборана. За найменшої концентрації 0,05 мкг/мл (а) щільність клітинної популяції зменшена у порівнянні з контролем, у полі зору спостерігали підвищену кількість клітин полігональної форми та полікаріоцитів. Ядра клітин округлі з чіткими ядерцями, цитоплазма клітин, в основному, дифузна, у деяких – слабовакуолізована. При підвищенні концентрації реагента А на порядок – 0,5 мкг/мл (б) в культурі клітин індукувалося утворення значної кількості багатоядерних клітин, що може свідчити про зміну метаболізму в клітинах, направлену на активацію синтетичних процесів та наростання патології мітозу (утворення трьохядерних клітин). Культивування клітин з реагентом А в концентраціях 5

мкг/мл (в) і 50 мкг/мл (г) призводило до зменшення щільності клітинного моношару, мітотичної активності клітин істотного підвищення кількості полікаріоцитів з числом ядер в клітинах більше двох та апоптотичних клітин.

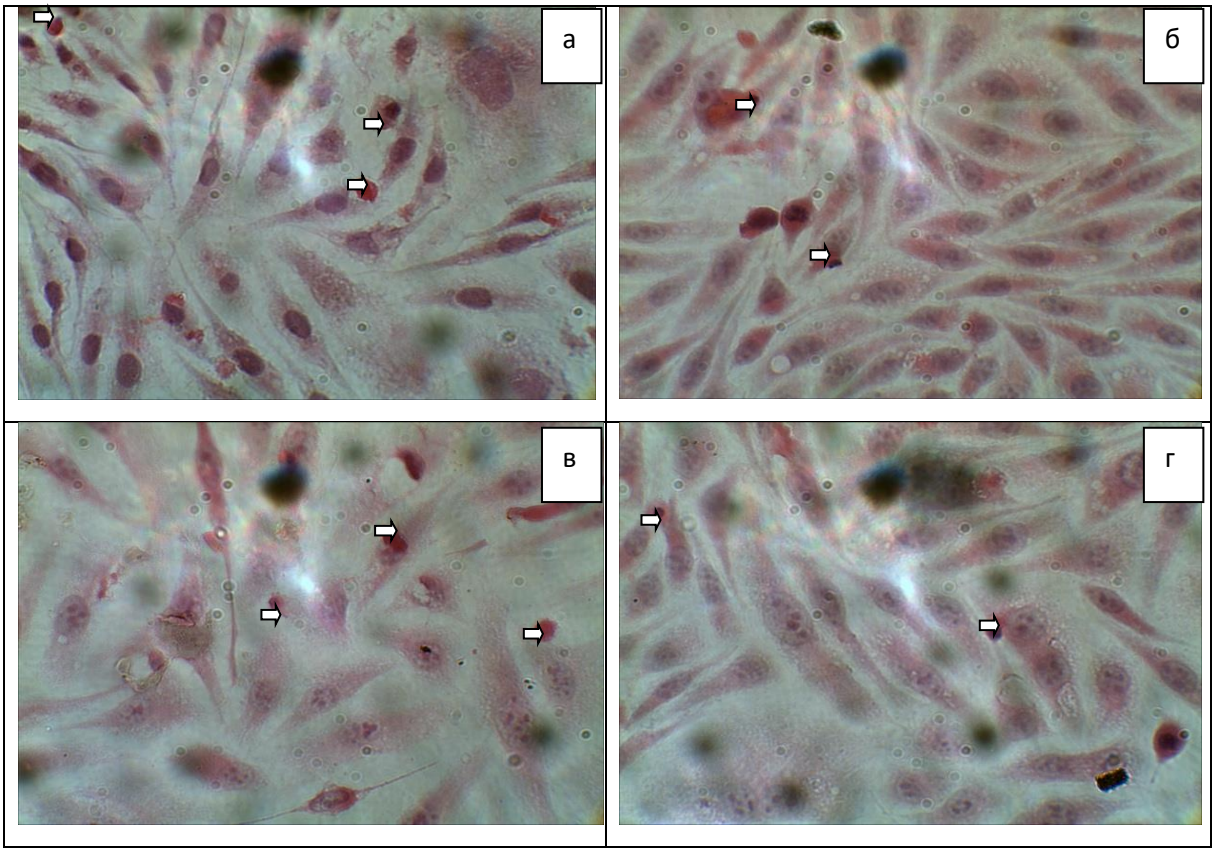

Рис. 3.19. Структура популяції клітин лінії L_{929} на 5-ту добу за комбінованого впливу червоного світла та реагента А в концентраціях 0,05 мкг/мл (а), 0,5 мкг/мл (б), 5 мкг/мл (в) та 50 мкг/мл (г). Стрілками позначені апоптотичні клітини. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення × 400.

Таким чином, поєднаний вплив на проліферуючі фібробластоподібні клітини лінії L_{929} червоного світла світлодіодів експериментального пристрою в дозі 60 Дж/см^2 та борвмісного НЗА з молекулярною структурою (1-карба-*клозо*-додекарборат цезію) з підвищенням концентрації призводив до інгібування виживання клітин, їх мітотичної активності.

3.3.3 Клітинні реакції в умовах впливу НЗА {5,10,15,20-тетракис[*n*-(1’-карба-*клозо*-додекарборан-1’-іл)тетрафторфеніл]-17,18-дигідропорфірин} натрію та червоного світла. Реагент Б відноситься до НЗА з досить високою молекулярною масою і складною стереохімічною будовою. Опромінення проліферуючих клітин лінії L_{929} (фаза логарифмічного росту) червоним світлом в присутності реагента Б (рис. 3.20) призводила до статистично достовірного зменшення щільності клітинного моношару та зміни морфологічної структури клітинної популяції за концентрацій 0,5; 5 і 500 мкг/мл.

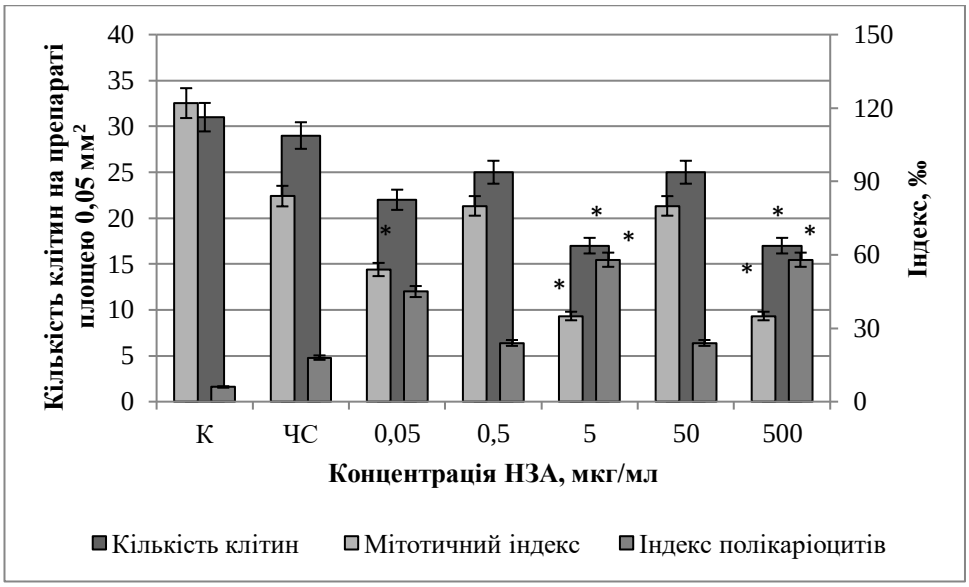

Рис. 3.20. Показники життєздатності (щільність клітинної популяції, мітотичний індекс, ‰, індекс полікаріоцитів, ‰) культури проліферуючих клітин лінії L_{929} (фаза логарифмічного росту) на 5-ту добу після інкубації їх з реагентом Б та опроміненням червоним світлом світлодіодів експериментальної термостатованої камери в дозі 60 Дж/см^2 (питома потужність дози 100 мВт/см^2, експозиція 10 хв).

Примітка. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Поєднаний вплив на культуру клітин реагента Б та червоного світла світлодіодів у фазі стаціонарного росту показав (рис. 3.21), що найістотніші морфофункціональні зміни спостерігалися при концентрації реагента Б 0,5

мкг/мл. За всіх інших концентрацій статистично достовірних змін щільності клітинної популяції у порівнянні з контролем не відмічали. Щільність клітинної популяції статистично достовірно не відрізнялась від інтактних культур клітин та впливу ЧС, за винятком концентрації 0,5 мкг/мл: кількість клітин перевищувала контрольні значення майже у 1,5 раза. Однак мітотичний індекс був суттєво знижений, оскільки всі культури досягли конфлуентного стану.

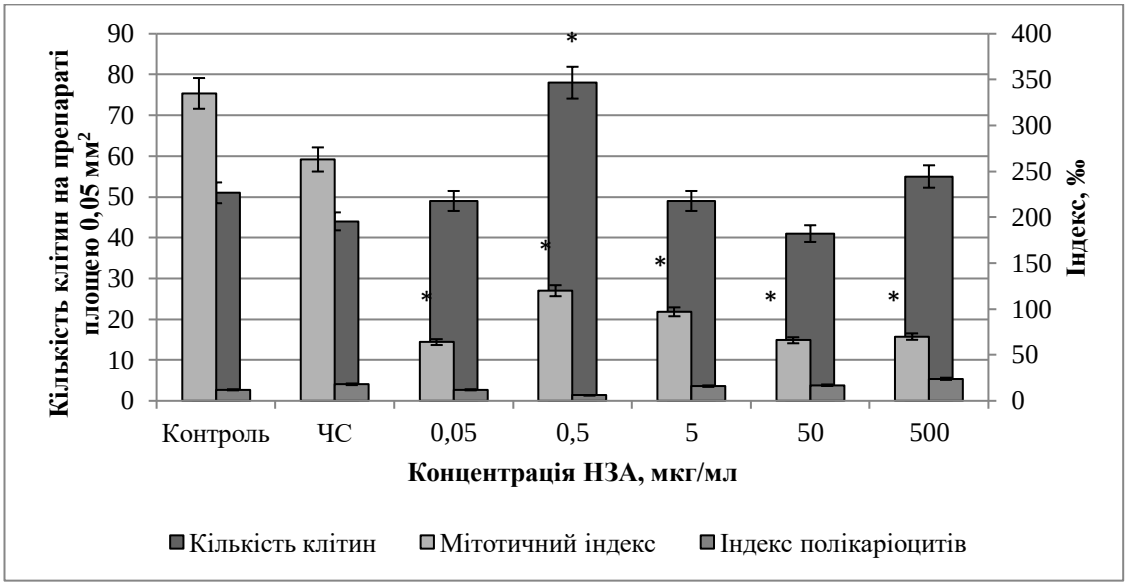

Рис. 3.21. Показники життєздатності (щільність клітинної популяції, мітотичний індекс, ‰, індекс полікаріоцитів, ‰) культури клітин лінії L_{929}, до якої на 5-ту добу (у фазі стаціонарного росту) добавали реагент Б та опромінювали червоним світлом світлодіодів експериментальної термостатованої камери в дозі 60 Дж/см^2 (питома потужність дози 100 мВт/см^2, експозиція 10 хв).

Примітка. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Лазерне випромінювання у поєднанні з реагентом Б спричиняє істотніші пошкодження клітин (рис. 3.22): щільність клітинної популяції зменшується у 2 – 4 рази порівняно з інтактними культурами клітин, статистично достовірно порівняно з контролем зменшується і мітотичний індекс.

Привертає увагу те, що за поєднаного впливу НЗА з молекулярною структурою реагентів А та Б та червоного світла світлодіодів в культурах клітин не відбувалось утворення надлишку гігантських багатоядерних клітин, що є особливістю впливу червоного світла на відміну від НЗА. Значну кількість гігантських полікаріоцитів спостерігали при інкубації клітин з реагентами А та Б.

Морфологічні зміни в культурі проліферуючих клітин за комбінованого впливу червоного світла та реагента Б виражались в зміні форми клітин, вони набували полігональної форми, відмічалося набухання та вакуолізація цитоплазми, спостерігали незначне підвищення гігантських форм багатоядерних та апоптотичних клітин. У полі зору при концентраціях 0,5 та 50 мкг/мл спостерігали значну кількість мітозів (рис. 3.23).

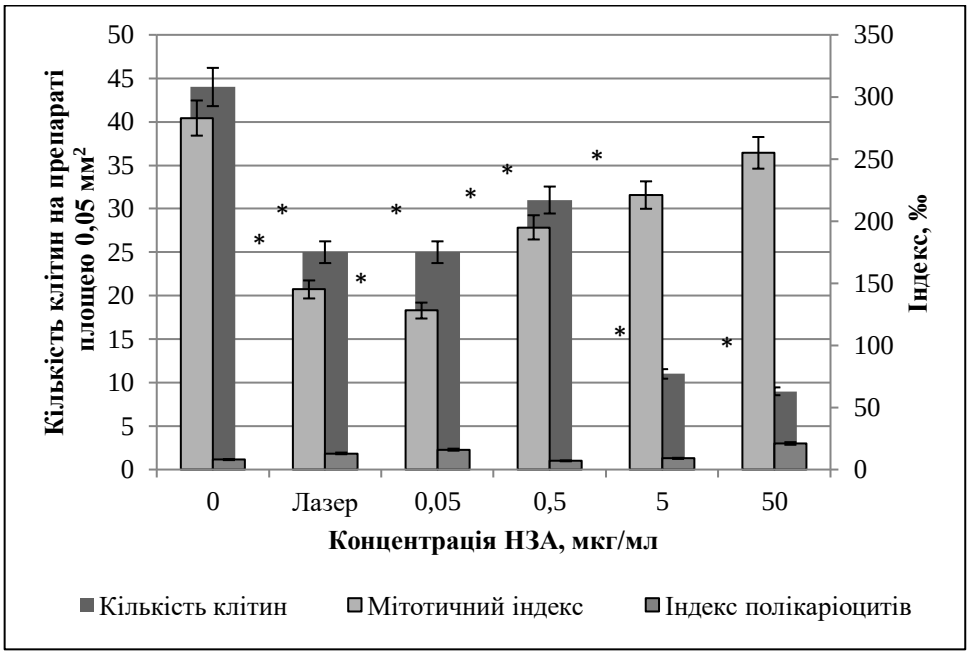

Рис. 3.22. Морфофункціональні зміни (виживання, %, мітотичний індекс, ‰, індекс полікаріоцитів, ‰) у культурі клітин лінії L_{929} за умов інкубації з борвмісним нейтронозахватним агентом {5,10,15,20-тетракис[*n*-(1’-карба-*клозо*-додекарборан-1’-іл)тетра-фторфеніл]17,18-дигідропорфірин}натрію у різних концентраціях та опромінювали червоним світлом Ge-Ne-лазера у дозі 60 Дж/см^2 (питома потужність дози 100мВт/см^2, експозиція 10 хв).

Примітка. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

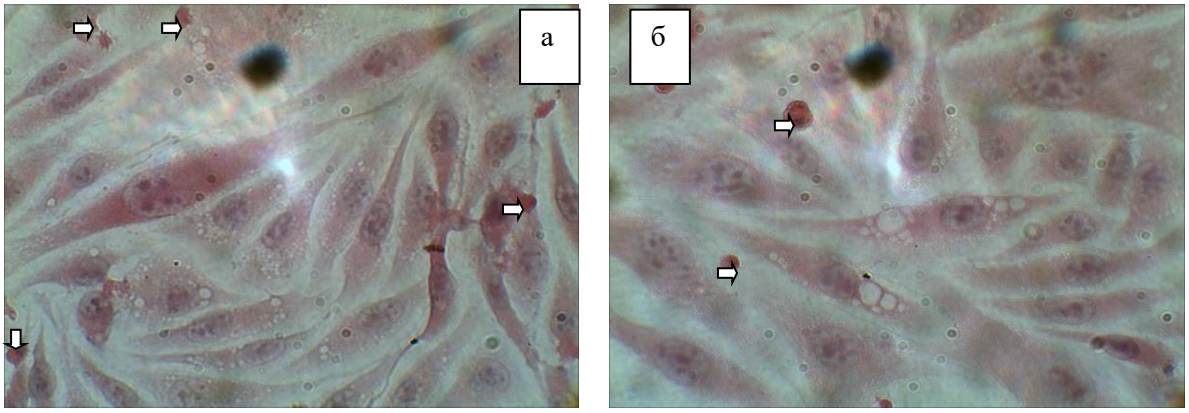

Рис. 3.23. Структура популяції клітин лінії L_{929} на 5 добу за комбінованого впливу червоного світла та реагента Б в концентраціях 0,05 мкг/мл (а) та 5 мкг/мл (б). Щільність клітинної популяції знижена, форма клітин зазвичай полігональна, ядра розміщені ацентрично, дифузної структури з чіткими ядерцями. Цитоплазма сильно вакуолізована. Стрілками позначені апоптотичні клітини. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення × 400.

Таким чином, за результатами експериментальних досліджень біологічна ефективність поєднаного впливу НЗА {5,10,15,20-тетракис[*n*-(1’-карба-*клозо*-додекарборан-1’-іл)тетра-фторфеніл]-17,18-дигідропорфірин} натрію та червоного світла спостерігалась тільки на проліферуючих клітинах, що знаходились у логарифмічній стадії росту.

3.4 Апоптоз в культурі фібробластоподібних клітин при дії молекулярних та нанорозмірних НЗА

Загальновідомо, що радіація не стільки зменшує проліферацію клітин, скільки селективно діє на експресію певних генів, так званих генів ранньої відповіді, що відповідають за синтез онкогенів, цитокінів, кіназ та інших регуляторів проведення сигналів у клітині, а також білків, що регулюють проходження клітинного циклу та розвиток апоптозу [50]. Щодо індукції

апоптозу досліджуваними НЗА даних в літературі не виявлено. Аналіз кількості анеуплоїдних клітин гіподиплоїдного типу у тест-системі культури проліферуючих клітин за умов впливу різних концентрацій нанокомпозитів і супрамолекулярних НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями (рис. 3.24) та червоного світла світлодіодів термостатованої експериментальної камери показав підвищення кількості клітин у стані апоптозу за усіх концентрацій реагентів.

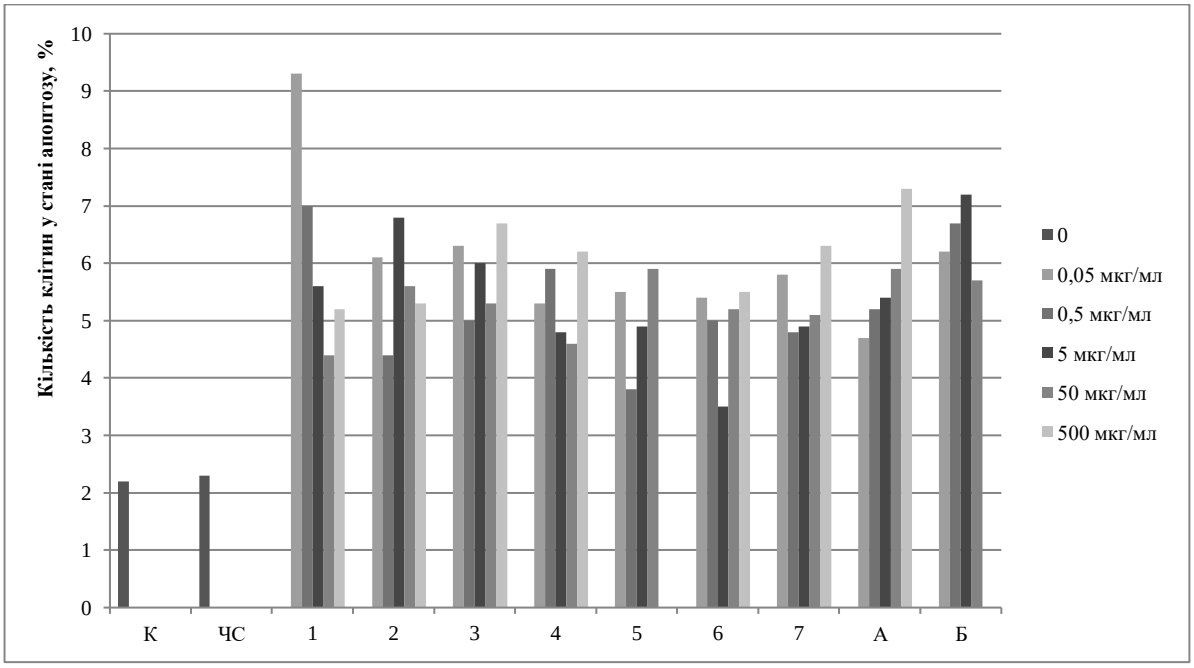

Рис. 3.24. Рівень апоптозу у культурі клітин лінії L_{929} на 5-ту добу інкубації з нанокомпозитами та нейтронозахватними агентами з фотосенсибілізуючими властивостями при опроміненні червоним світлом світлодіодів експериментальної термостатованої камери в дозі 60 Дж/см^2 (питома потужність дози 100 мВт/см^2, експозиція 10 хв). Позначення на рисунку: К – інтактні клітини; ЧС – опромінення світлом червоного діапазону; 1 – ГА/ Gd; 2 – $Fe_2O_4/2Gd_2O_3$; 3 – $Fe_2O_4/GdBO_3$; 4 – Fe_2O_4/γ-АПС/DTPA-Gd; 5 – $Fe_2O_4/2Gd_2O_3$/ГА; 6 – Fe_3O_4/ДМСК/Gd; 7 – Fe_3O_4/з олеатом натрію.

Магнітокеровані нанокомпозити, що містили нейтронозахватний агент (бор чи гадоліній) індукували апоптоз у культурі клітин (див. рис. 3.24) в залежності від концентрації реагента: підвищення концентрації НЗА викликало збільшення кількості апоптотичних клітин, за винятком реагента 4 (ферит модифікований γ-АПС та ДТПК), найвища концентрація якого не підвищувала апоптоз в культурі клітин порівняно з контролем. Магнітна речовина (реагент 7) в найвищій та найнижчій концентраціях при інкубації з клітинами не індукувала апоптоз, але за концентрацій в межах 0,5 – 50 мкг/мл його рівень мав тенденцію до підвищення. Аналогічно тенденцію до підвищення можна констатувати і для реагента 6 в досліджуваному діапазоні концентрацій (0,005 – 500 мкг/мл).

Визначення апоптозу в культурах клітин, що опромінювались у стаціонарній фазі розвитку (рис. 3.25), показало полімодальний характер його зміни залежно від концентрації та виду НЗА.

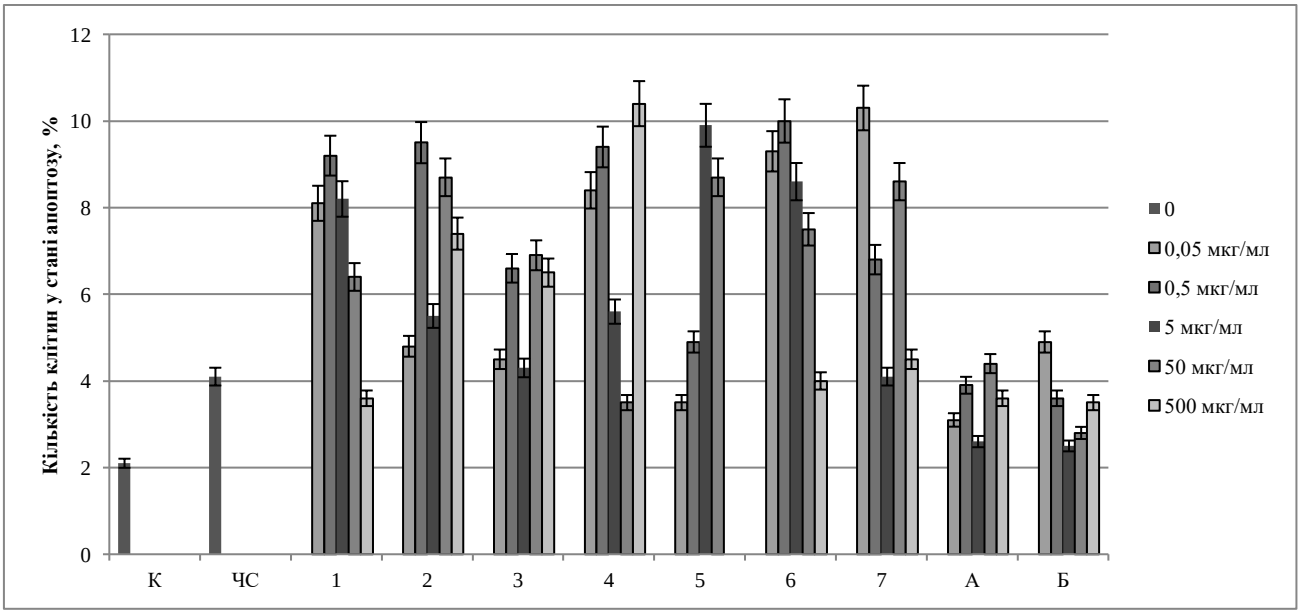

Рис. 3.25. Апоптоз у культурі клітин лінії L_{929}, до якої на 5-ту добу (у фазі стаціонарного росту) додавали нанокомпозити та нейтронозахватні агенти з фотосенсибілізуючими властивостями і опромінювали червоним світлом світлодіодів експериментальної термостатованої камери в дозі 60

Дж/см^2 (питома потужність дози 100 мВт/см^2, експозиція 10 хв). Позначення на рисунку: К – інтактні клітини; ЧС – опромінення світлом червоного діапазону; 1 – ГА/ Gd; 2 – $Fe_2O_4/2Gd_2O_3$; 3 – $Fe_2O_4/GdBO_3$; 4 – Fe_2O_4/γ-АПС/DTPA-Gd; 5 – $Fe_2O_4/2Gd_2O_3$/ГА; 6 – Fe_3O_4/ДМСК/Gd; 7 – Fe_3O_4/з олеатом натрію.

Встановлено, що біологічна ефективність випромінювання з довжиною хвилі 630 нм (червоне світло) залежить від його фізичних характеристик: питомої потужності (мВт/см^2) та тривалості опромінення (сек). Опромінення клітин червоним світлом у дозі 60 Дж/см^2, але за різних умов (50 мВт/см^2 за 20 хв та 100 мВт/см^2 за 10 хв) викликає різноспрямовані морфофункціональні зміни у тест-системі культури трансформованих клітин.

Комбінований вплив гадоліній- та борвмісних нанокомпозитів і фотосенсибілізаторів з молекулярною структурою в діапазоні концентрацій 0,05 – 500 мкг/мл та червоного світла в дозі 60 Дж/см^2 (100 мВт/см^2 за 10 хв) на проліферуючі клітини та клітини у стаціонарній фазі росту мав різну ефективність: призводив за певних концентрацій до ушкодження проліферуючих клітин і не змінював або активував проліферацію в культурі клітин в стаціонарній фазі росту.

Поєднана дія нейтронозахватних агентів (нанокомпозитів і фотосенсибілізаторів) та червоного світла індукували апоптоз у культурі клітин незалежно від її стану.

3.5 Морфофункціональні зміни у тест-системі культури клітин за комбінованого впливу молекулярних та нанорозмірних нейтронозазватних агентів, світлового випромінювання та нейтронів спектру поділу

3.5.1 Особливості біологічних ефектів у клітинах *in vitro* за комбінованої дії нейтронів спектру поділу, світлового випромінювання червоного спектру та нейтронозахватних агентів з фотосенсибілізуючими властивостями.

Борнейтроно-захватна терапія (БНЗТ) – це методика, розроблена для опромінення радіорезистентних пухлин на клітинному рівні.

Вперше концепція БНЗТ була запропонована після відкриття Чедвиком нейтрона (1932 р.) і розробок Голдхабера (1934 р.), в яких було встановлено, що природній ізотоп ^{10}B має великий переріз захоплення теплових нейтронів [1, 53]. Для ефективної деструкції пухлинних клітин необхідно дотримуватись двох умов: наявність достатньої кількості іонів бору-10 чи гадолінію-157 та оптимального потоку повільних нейтронів (дози нейтронів) для успішної реакції. Але гамма-кванти, що утворюються в результаті реакції, будуть пошкоджувати не тільки клітини пухлини, але й нормальні клітини, що оточують пухлину. Тому одним із методичних прийомів для підвищення ефективності нейтронозахватної терапії при умові зменшення дози нейтронного опромінення може бути застосування фотодинамічної терапії (світло червоного діапазону) із застосуванням нейтронозахватних агентів з властивостями фотосенсибілізатора.

Результати експериментального дослідження у порівняльному аспекті на моделі *in vitro* (проліферуючі клітини пухлини) біологічної ефективності нейтронів у дозі 1 Гр та комбінованого впливу нейтронів і червоного світла в дозі 60 Дж/см^2 (питома потужність дози 100 мВт, експозиція 10 хв) спільно з молекулярними борвмісними НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями 1-карба-*клозо*-додекарборат цезію (молекулярна маса 278 мг) – реагент А та

{5,10,15,20-тетракис[*п*-(1’-карба-*клозо*-додекарборан-1’-іл)тетрафторфеніл]17,18-дигідропорфірин}натрію (молекулярна маса 1565 мг) – реагент Б представлені на рис. 3.26 і 3.27. Було показано, що опромінення клітин нейтронами спектру поділу статистично достовірно ($p < 0,05$) викликало загибель 30 % клітин. Застосування нейтронозахватного агента з фотосенсибілізуючими властивостями (реагент А – карборан чи реагент Б - порфірин) інактивувало ще 35 % клітин. Насамкінець застосування червоного світла у комплексі з нейтронами і НЗА призводило до загибелі від 85 % до 93 % клітин. Мітотична активність в культурі клітин за цих умов пригнічувалась у 2–2,5 рази, тоді як кількість багатоядерних клітин зростала майже у 5 разів. Слід відмітити, що за нейтронного опромінення в культурі клітин спостерігали полікаріоцити з великою кількістю ядер (6–8) (див. рис. 3.56, 3.58), що вказує на механізм пошкодження ДНК клітин переважно шляхом двониткових розривів та гальмування процесів їх репарації.

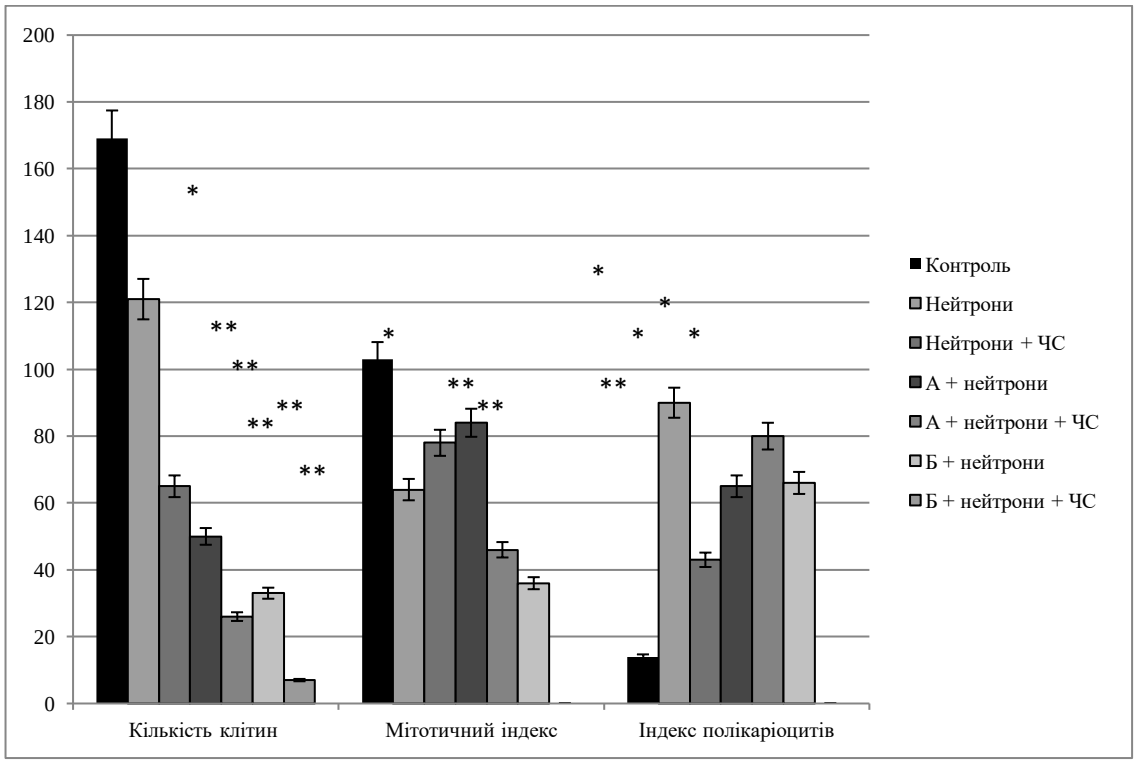

Рис. 3.26. Показники життєздатності клітин лінії L_{929} на 5-ту добу культивування після опромінення нейтронами спектру поділу в дозі 1 Гр та у

поєднанні з червоним світлом від світлодіодів і молекулярними НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями (реагенти А і Б) в концентрації 5 мкг/мл. Пояснення до рисунка: ЧС – червоне світло, А – реагент А, Б – реагент Б. На осі ординат – кількість клітин на площі препарату 0,05 мм^2, мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів у ‰.

Примітки:

1. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.
2. ** – відмінності достовірні у порівнянні з опроміненням нейтронами спектру поділу, $p < 0,05$.

Структурні зміни в культурі проліферуючих клітин за нейтронного опромінення в дозі 1 Гр характеризувались появою значної кількості атипових багатоядерних клітин (рис. 3.27, а), клітин з мікроядрами та апоптотичних клітин. Опромінення таких клітин червоним світлом призвело до появи нежиттєздатних трьох- та багатополюсних мітозів (рис. 3.56, б). Інкубація клітин з реагентом А за нейтронного опромінення викликала гіпервакуолізацію цитоплазми, утворення значної кількості клітин з мікроядрами та посилювала апоптоз. Додаткова дія червоного світла призводила до істотних деструктивних проявів в культурі клітин, до їх загибелі. Ще більш негативні наслідки спостерігались при застосування реагента Б – відбувалась повна деструкція моношару клітин.

Як показали дослідження, результати яких викладені у попередніх підрозділах, магнітокеровані гадолінійвмісні нанокомпозити на основі магнетиту, модифіковані γ-АПС/ДТПК (реагент 4) та ДМСК (реагент 6) можуть бути ефективними НЗА при опроміненні нейтронами спектру поділу та світлом червоного діапазону. Загалом вони виявились малотоксичними, але за опромінення монохроматичними червоним світлом показали високу ефективність в якості фотосенсибілізаторів.

Застосування цих реагентів як НЗА, тобто за опромінення нейтронами спектру поділу, показало, що ефективність їх відрізняється: реагент 4 у

поєднанні з нейтронами та червоним світлом викликав більшу загибель проліферуючих клітин – 89 % від контролю та 51 % порівняно тільки з опроміненням нейтронами та червоним світлом (рис. 3.28). Для реагента 6 ці показники становили 68 % від контролю та 17 % у порівнянні з опроміненням нейтронами та червоним світлом. Водночас інгібувалась мітотична активність клітин, а кількість полікаріоцитів була значна, хоча і менша за показники нейтронного опромінення.

Структурні зміни популяції клітин теж були досить помітні (рис. 3.28), але не настільки деструктивні, як за молекулярних НЗА: в культурі спостерігали гігантські багатоядерні клітини, характерні для нейтронів спектру поділу, апоптотичні тільця та вакуолізацію цитоплазми, істотне зменшення щільності моношару клітин.

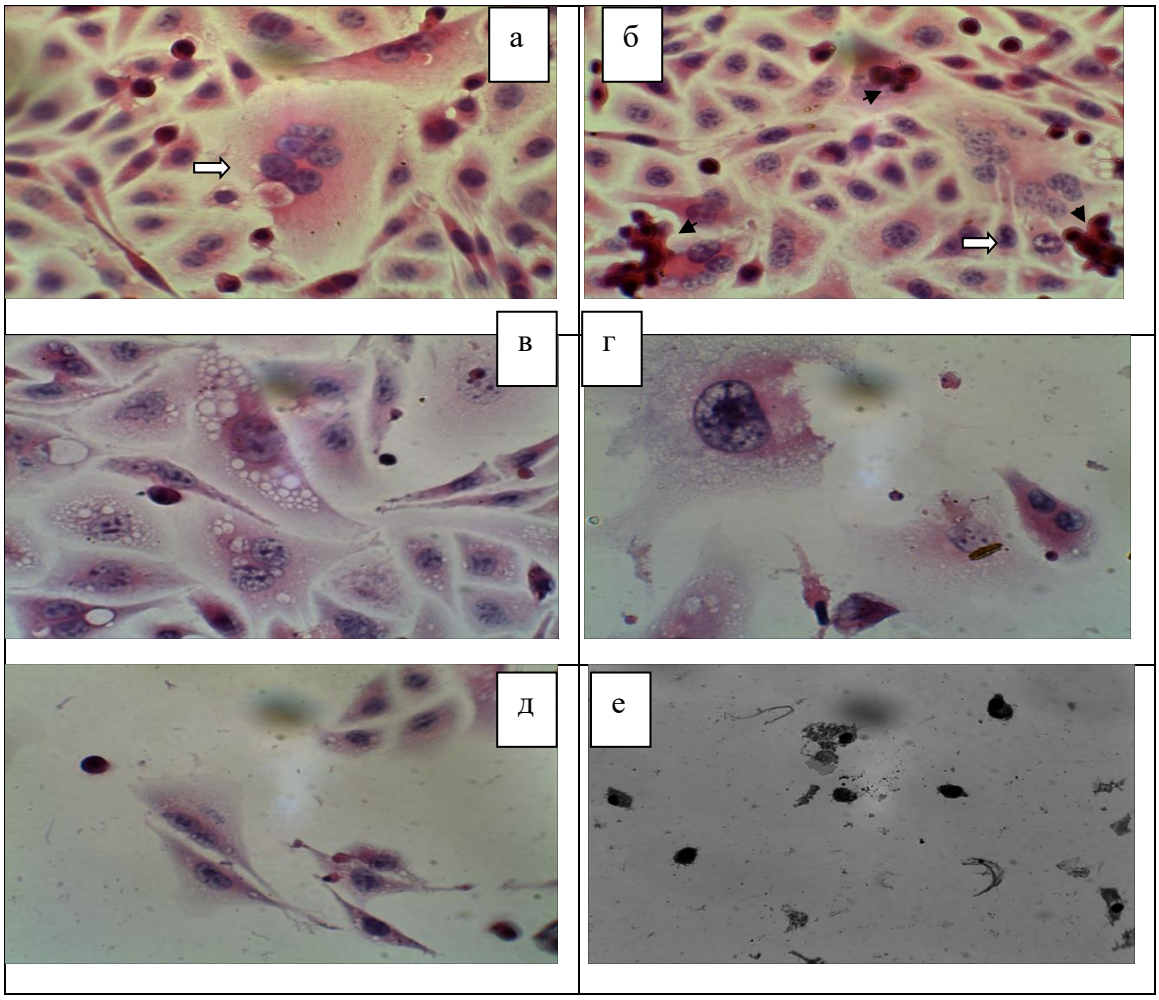

Рис. 3.27. Структура популяції клітин лінії L_{929} на 5-ту добу в контролі (а), після опромінення нейтронами спектру поділу в дозі 1 Гр (б) та при поєднаній дії нейтронів в дозі 1 Гр і НЗА (реагента А (в) та реагента Б (д)) в концентрації 5 мкг/мл, а також за дії нейтронів, червоного світла та НЗА: реагент А – (г), реагент Б – (е). Стрілками позначені гігантські багатоядерні клітини – полікаріоцити. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення × 1000.

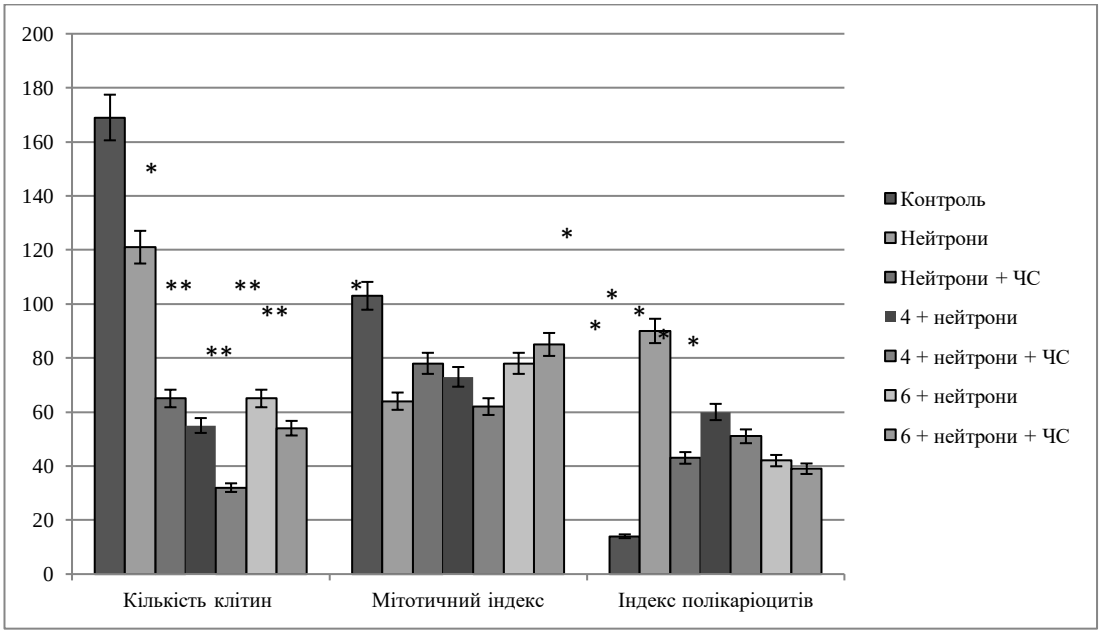

Рис. 3.28. Характеристика життєздатності клітин лінії L_{929} після опромінення нейтронами спектру поділу в дозі 1 Гр та у поєднанні з червоним світлом від світлодіодів і гадолінійвмісними нанокомпозитами (реагенти 4 і 6) в концентрації 5 мкг/мл на 5-ту добу культивування. Пояснення до рисунка: ЧС – червоне світло, 4 – реагент 4, 6 – реагент 6. На осі ординат – кількість клітин на площі препарату 0,05 мм^2, мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів у ‰.

Примітки:

1. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

2. ** – відмінності достовірні у порівнянні з опроміненням нейтронами спектру поділу, $p < 0,05$.

Дослідження ефективності магніточутливого гадолінійвмісного нанокомпозита модифікованого гідроксиапатитом – реагента 5 ($Fe_3O_4/2Gd_2O_3$/ГА) за комбінованого впливу нейтронів спектру поділу і світла червоного діапазону виявило (рис. 3.30 та 3.31, а, б) домінуючу роль на клітинні реакції нейтронного опромінення.

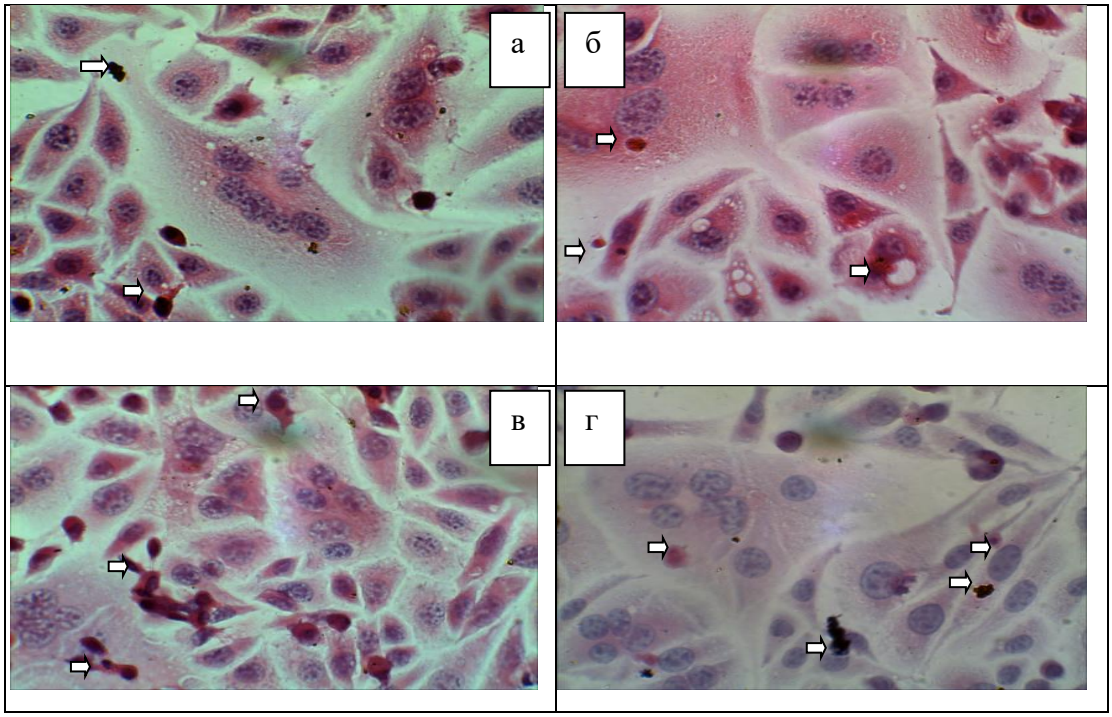

Рис. 3.29. Структура популяції клітин лінії L_{929} на 5-ту добу за комбінованого впливу нейтронів спектру поділу, реагентів 4 (а) та 6 (в) в концентрації 5 мкг/мл та червоного світла (б) і (г). Стрілками позначені апоптотичні клітини. Пофарбування гематоксиліном та еозином. Збільшення × 1000.

Завдяки двом молекулам гадолінію-157 біологічна ефективність нанокомпозиту висока: за поєднаної дії нейтронів і червоного світла виживало тільки 17 % клітин, мітотична активність в культурі клітин була низькою, однак відмічали багато полікаріоцитів з характерною для нейтронів підвищеною кількістю ядер і мікроядер. Слід відмітити, що за цих умов

змінювалась форма клітин та ядерно-цитоплазматичне співвідношення та спостерігалась вакуолізація цитоплазми (див. рис. 3.31 а, б).

Наявність атома бору-10 у гадолінійвмісному нанокомпозиті реагенті 3 не сприяла підвищенню ушкоджуючої дії на клітини нейтронного опромінення (рис. 3.30). Додаткове опромінення дослідних культур клітин світлом червоного діапазону удвічі збільшило загибель клітин та блокувало їх поділ, що призвело до деструкції моношару (рис. 3.31, в, г).

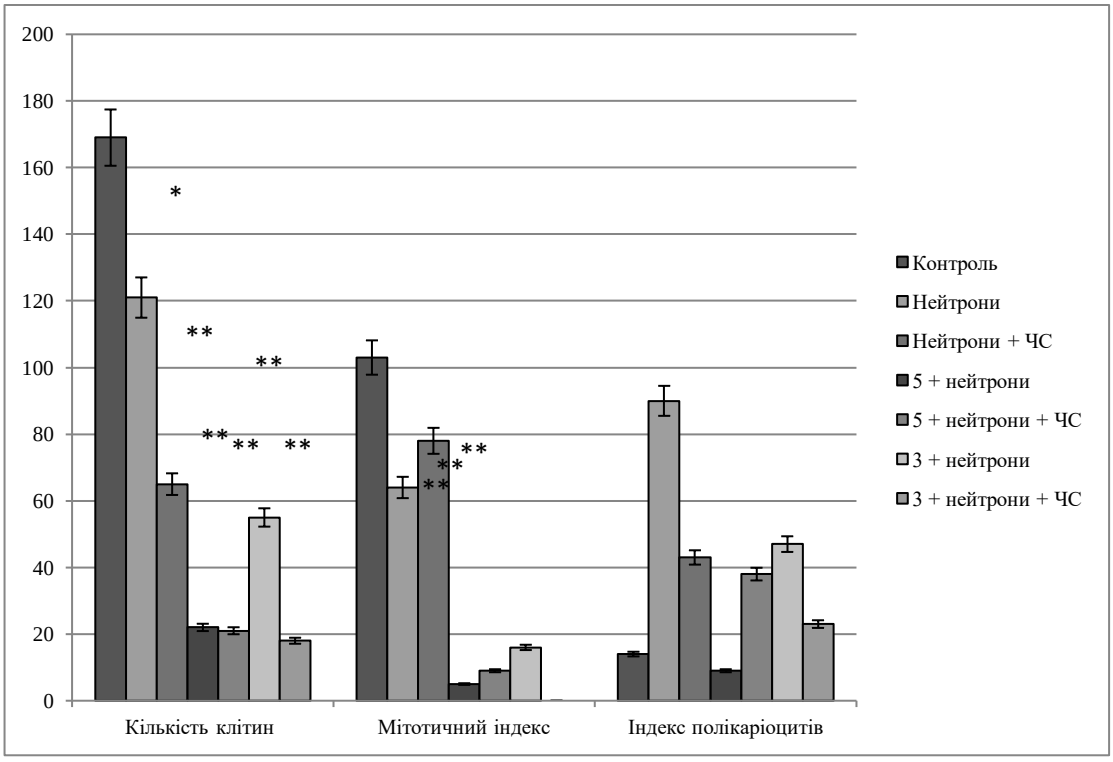

Рис. 3.30. Життєздатність клітин лінії L_{929} на 5-ту добу культивування після опромінення нейтронами спектру поділу в дозі 1 Гр та у поєднанні з червоним світлом від світлодіодів і гадолінійвмісним нанокомпозитом модифікованим гідроксиапатитом (реагент 5) та бор-гадолінійвмісним нанокомпозитом (реагент3) в концентрації 5 мкг/мл. Пояснення до рисунка: ЧС – червоне світло, 5 – реагент 5, 3 – реагент 3. На осі ординат – кількість клітин на площі препарату 0,05 мм^2. Мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів у ‰.

Примітки:

1. * – відмінності достовірні у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

2. ** – відмінності достовірні у порівнянні з опроміненням нейтронами спектру поділу, $p < 0,05$.

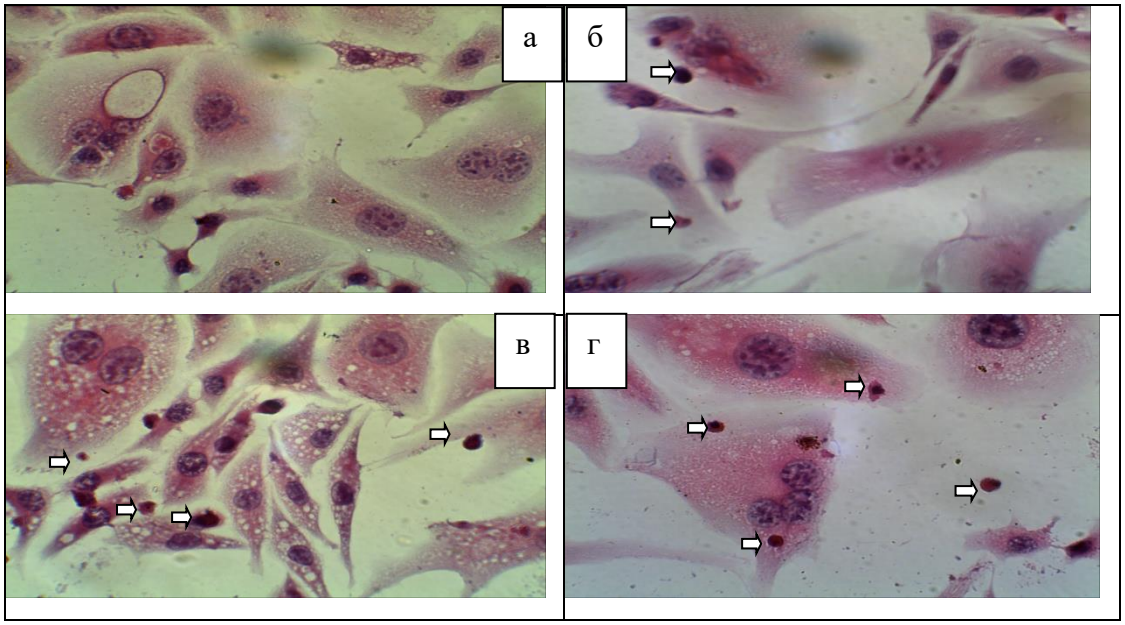

Рис. 3.31. Структура популяції клітин лінії L_{929} на 5-ту добу за комбінованого впливу нейтронів спектру поділу, реагентів 5 (а) та 3 (в) в концентрації 5 мкг/мл та червоного світла (б) і (г). Стрілками позначені апоптотичні клітини. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення × 1000.

Таким чином, аналіз ефективності поєднаного застосування двох бінарних методів для деструкції пухлинних клітин та тканин показав, що важливе значення має структура та склад нейтронозахватних агентів з фотосенсибілізуючими властивостями. За однакових умов впливу (доза нейтронів спектру поділу – 1 Гр та доза червоного світла – 60 Дж/см^2) найбільш ефективно на клітини тест-системи культури проліферуючих клітин діяли молекулярні НЗА – реагенти А та Б, які містили атоми бору-10. Магнітокеровані нанокомпозити різного складу теж показали деструктивну здатність, але домінуючим було нейтронне опромінення.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

В сучасних умовах активно розвиваються два бінарних методи лікування резистентних форм раку – нейтронозахватна терапія та фотодинамічна терапія, перевагою яких є висока селективність ураження новоутворення. На сьогодні важливим є пошук та дослідження нейтронозахватних агентів з фотосенсибілізуючими властивостями для проведення до клінічних досліджень бінарних променевих технологій у лікуванні неоплазми.

Досліджені біологічні ефекти при інкубації клітин з нейтронозахватними агентами з фотосенсибілізуючими властивостями, що мають молекулярну (карборан, порфірин) або наноструктуру (магнітокеровані нанокомплекси різного складу на основі фериту з атомами бору-10 чи гадолінію-157). Встановлено межі їх цитотоксичності та особливості впливу на морфофункціональні характеристики клітин. Показано, що магнітокеровані нанокомпозити з гадолінієм та бором, модифіковані діетилентриамінпентаоцтовою кислотою та мезо-2,3-димеркаптосукциновою кислотою, мали високу біосумісність до клітин: за інкубації клітин з такими нейтронозахватними агентами в досліджуваному діапазоні концентрацій не виявили їх цитотоксичності, окрім максимальних концентрацій для фериту з бором та гадолінієм. За цих умов зменшувались адгезивні властивості клітин. Магнітокеровані нанокомпозити, які містили нейтронозахватний агент (бор чи гадоліній), індукували апоптоз у культурі клітин в залежності від концентрації реагента: збільшення кількості апоптотичних клітин спостерігали в області концентрацій 0,5 – 50 мкг/мл. За найменших (0,05 мкг/мл) та найбільших (500 мкг/мл) концентрацій реагентів кількість апоптотичних клітин не відрізнялась від контролю.

Встановлено, що комбінований вплив гадоліній- та борвмісних нейтронозахватних агентів з молекулярною та наноструктурою в діапазоні концентрацій 0,05 – 500 мкг/мл та червоного світла в дозі 60 Дж/см2 (100

мВт/см2 за 10 хв) призводив до різноспрямованих клітинних ефектів у тест-системах проліферуючих клітини чи клітин у стаціонарній фазі росту.

Показано, що монохроматичне лазерне випромінювання в дозі 60 Дж/см2 (100 мВт/см2 за 10 хв) при поєднанні з нейтронозахватними агентами з фотосенсибілізуючими властивостями справляє сильнішу ушкоджуючу дію на проліферуючі клітини, ніж розсіяне світло світлодіодів: щільність клітинної популяції зменшується у 2 – 4 рази порівняно з інтактними культурами клітин, статистично достовірно ($p < 0,05$) порівняно з контролем зменшується і мітотичний індекс. Особливістю впливу світла червоного діапазону була відсутність індукції в культурі клітин атипових полікаріоцитів. Поєднана дія нейтронозахватних агентів та червоного світла (розсіяного від світлодіодів і монохроматичного лазерного) індукували апоптоз у культурі клітин незалежно від стадії культивування.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено біологічні ефекти при інкубації клітин з нейтронозахватними агентами з фотосенсибілізуючими властивостями, що мають молекулярну (карборан, порфірин) або наноструктуру (магнітокеровані нанокомплекси різного складу на основі фериту з атомами бору-10 чи гадолінію-157). Встановлено межі їх цитотоксичності та особливості впливу на морфофункціональні характеристики клітин. Показано, що в присутності в клітинах молекулярного нейтронозахватного агента 1-карба-*клозо*-додекарборат цезію в різних концентраціях спостерігали зміни показників життєздатності (виживання, проліферативної та мітотичної активності клітин, полікаріоцитів та апоптозу) в залежності від концентрації реагента. При використанні найвищої досліджуваної концентрації 5 мкг/мл спостерігали деградацію моношару клітин до 60%. За найменшої концентрації 0,05 мкг/мл зміни показників життєздатності статистично не достовірні. культивування клітин з іншим молекулярним нейтронозахватним агентом {5,10,15,20-тетракис[*n*-(1’-карба-*клозо*-додекарборан-1’-іл)тетрафторфеніл]-17,18-дигідропорфірин} натрію призводить до зменшення щільності клітинної популяції та збільшення багатоядерних клітин в культурі на 40% за всіх досліджуваних концентрацій реагента.

2. Аналіз морфофункціональних показників виживання, мітотичної активності та апоптозу в культурі клітин лінії L_{929} в умовах інкубації з НЗА (карборанів та порфіринів) у різних концентраціях показав, що для них характерні різні механізми впливу на клітини: карборани індукують загибель клітин шляхом апоптозу, порфірини – за рахунок репродуктивної загибелі.

3. Встановлено, що біологічна ефективність нанокомпозитів залежала від складності структури наночастинок. Реагент, що містив гадоліній-157 та гідроксиапатит не проявив цитотоксичних властивостей, в той час як нанокомпозит фериту, гадолінію-157 та гідроксиапатиту

призводив до ослаблення адгезивних властивостей клітин та був цитотоксичним при підвищенні його концентрації: на 20 – 30 % зменшувались кількість клітин та в 5 разів їх мітотична активність, натомість кількість апоптотичних клітин в культурі та кількість полікаріоцитів у 7–8 разів перевищувала контрольні показники.

4. Виявлено, що біологічна ефективність випромінювання з довжиною хвилі 630 нм (червоне світло) залежить від його фізичних характеристик: питомої потужності (мВт/см^2) та тривалості опромінення (сек). Опромінення клітин світлом червоного діапазону у дозі 60 Дж/см^2, але за різних умов (50 мВт/см^2 за 20 хв та 100 мВт/см^2 за 10 хв) викликає різноспрямовані (з різницею 40%) морфофункціональні зміни у тест-системі культури клітин лінії L_{929}.

5. За поєднаного впливу нейтронозахватних агентів та червоного світла спостерігали індукцію апоптозу у культурі клітин незалежно від стадії культивування.

6. Виявлено, що наявність атома бору-10 у гадолінійвмісному нанокомпозиті за поєднаної дії нейтронного опромінення та світла червоного діапазону призвела до підвищення загибелі клітин у 2 рази порівняно з опроміненням нейтронами, повного інгібування мітотичної активності, та деструкції моношару культури клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Пучки нейтронов для терапии: Обзор / Э. Л. Купленников, А. Н. Довбня, Ю. Н. Телегин, В. А. Цымбал, С. С. Кандыбей. – Харьков : ННЦХФТИ, 2011. – 31 с.

2. Абдуллаева Г. А. Использование реактора ВВР-СМ для развития метода нейтронзахватной терапии в Узбекистане / Г. А. Абдуллаева, Ю. Н. Коблик, Г. А. Кулабдуллаев // Известия РАН, сер. Физика. – 2009. – Т. 73. – № 4. – С. 540–543.

3. Наврузов С. Н. Экспериментальное обоснование нейтронзахватной терапии на горизонтальном канале иследовательского атомного реактора ВВР-СМ Института ядерной физики Республики Узбекистан / С. Н. Наврузов, Ж. Н. Каххоров, Н. Х. Ходжаева // Арх. клин. эксп. мед. – 2014. – Т. 23, № 1. – С. 20–22.

4. Цыб А. Ф. Терапевтическая радиология (руководство для врачей) / А. Ф. Цыб, Ю. С. Мардынский // М.: «МК», 2010. – 552 с.

5. Barth R. F. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects / R. F. Barth, J. A. Coderre, M. G. Vicente, T. E. Blue // Clin Cancer Res. – 2005. – No. 11. – P. 3987–4002.

6. Salt C. Boron and gadolinium neutron capture therapy / C. Salt, A. J. Lennox, M. Takagaki, J. A. Maguire, N. S. Hosmane // Russian Chemical Bulletin. – 2004. – Vol. 53, Issue 9. – P. 1871–1888.

7. Перспективы создания медицинского ускорителя для нейтронной и нейтронзахватной терапии / Ю. С. Мардынский [и др.] // Мат. VII Всеросс. научн. форума. Радиология.– М., 2006. – С. 157.

8. Carboranylporphyrins for boron neutron capture therapy of cancer / Evstigneeeva R. P. [et al.] // Current Medicinal Chemistry – Anticancer Agents. – 2003. – № 3. – P. 383–392.

9. Novel boron containing derivatives of 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin: synthesis and toxicity for drug-resistant tumor cells /

Ol'shevskaya V. A. [et al.] // Bioorganic and Medicinal Chemistry. – 2006. – Vol. 14, 1. – P. 109–120.

10. Влияние эпитепловых нейтронов на жизнеспособность опухолевых клеток глиобластомы in vitro / Л. А. Мостович [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2011. – № 2. – С. 229–233.

11. Радиобиологическое тестирование терапевтического нейтронного пучка линейного ускорителя КГ-25 / С. Е. Ульяненко [и др.] // 6 Съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность) : Тезисы докладов. – Москва, 2010. – С. 245.

12. The effect of Boron neutron capture therapy targeting tumor endothelial cells to clinically relevant radioresistant cells / Y. Kuwahara [et al.] // KURRI Progr. Rept. – 2010. – C. 149.

13. Сравнение биологической эффективности импульсного и непрерывного нейтронного излучения с энергией в 14 МэВ на культуре клеток мышиной меланомы В-16 / Е. В. Исаева [и др.] // Радиация и риск. – 2012. – № 2. – С. 83–90.

14. From radiation-induced chromosome damage to cell death: Modeling basic machanisms and applications to boron neutron capture therapy / F. Baltarini [et al.] // Radiat. Prot. Dosim. – 2011. – № 2-4. – C. 523–527.

15. Анализ особенностей распределения BSH и BPA с целью повышения эффективности нейтронозахватной терапии / А. П. Баранов [и др.] // Российский терапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 15–21.

16. Design of multivalent galactosyl carborane as a targeting specific agent for potential application to boron neutron capture therapy / Lai C.-H. [et al.] // Chem. Commun. – 2012. – № 4. – C. 612–614.

17. Новые карборанилпорфины на основе 2-формил-5, 10, 15, 20-тетрафенилпорфирина и функциональнозамещенных о- и м-карборанов: синтез и биологические свойства / В. А. Ольшевская [и др.] // Доклады Академии наук. – 2007. – Т. 414, № 2. – С. 199–203.

18. Новые методы создания борсодержащих соединений для адресной доставки бора в клетки опухолей [Текст] / К. Ю. Жижин [и др.] // Рос. биотерапевт. журнал. – 2010. – №3. – С.10–11.

19. Хмелевський Є. В. Сучасний стан та перспективи нейтронозахватної променевої терапії [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v7/papers/khmelevsky_v7.htm.

20. Беляева Л. А. Основы флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии (обзор литературы) / Л. А. Беляева, А. А. Степанян, Л. В. Адамян // Проблемы репродукции. – 2004. – № 1. – С. 6–11.

21. Гамалея Н. Ф. Фотодинамическая терапия — эффективный метод лечения больных со злокачественными опухолями / Н. Ф. Гамалея, Куценок В. В. // Doctor. – 2003. – Vol. 4. – P. 28–31.

22. Москвин С. В. Основы лазерной терапии / С. В. Москвин, В. А. Буйлин. – М. – Тверь : Изд-во «Триада», 2006. – 256 с.

23. Цыб А. Ф. Возможности и перспективы применения фотодинамической терапии (экспериментальные и клинические исследования) / А. Ф. Цыб, М. А. Каплан // Российские медицинские вести. – 2002. – № 3. – С. 19–24.

24. Олюшин В. Е. Новый способ фотодинамической терапии в комплексном лечении глиальных опухолей головного мозга / В. Е. Олюшин, А. В. Комфорт, А. Ю. Улитин // Российский терапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 66–85.

25. Куценок В. В. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей [Текст] / В. В. Куценок, Н. Ф. Гамалея // Онкология. – 2003. – Т. 5, № 1, 69–72.

26. Способ повышения эффективности лечения меланомы / Р. Г. Никитина [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 8. – С. 209–212.

27. Гельфонд М. Л. Применение традиционной и интраоперационной ФДТ явилось эффективным компонентом комбинированного лечения

злокачественных новообразований, существенно улучшающим качество, а в ряде случаев и продолжительность жизни больных / М. Л. Гельфонд // Практическая онкология. – 2007. – Т. 8, № 4. – С. 22–24.

28. Henderson B. W., Dougherty T. J. How does photodynamic therapy work? / B. W. Henderson, T. J. Dougherty // Photochem. Photobiol. – 1992. – Vol. 55. – P. 145–157.

29. Фотоактивний імунокон'югат гематопорфірину з антитілами до фактору росту ендотеліальних клітин (VEGF): отримання, фізико-хімічні та біологічні властивості / І. О. Лісняк [та ін.] // Біополімери і клітина. – 2009. – Т. 25, № 1. – С. 56–61.

30. Флуоресцентний аналіз накопичення 5-АЛК – індукованого протопорфірину-ІХ у пухлинній та нормальній тканинах мишей / В. В. Куценок [та ін.] // Укр. радіол. журнал. – 2006. – № 1. – С. 38–41.

31. Куценок В. В. Ефективність фотодинамічної терапії пухлин з використанням 5- амінолевулінової кислоти (експериментальне дослідження): дис. ...д-ра мед. наук: 14.01.07 / Куценок Вадим Васильович. – К., 2005. – 356 с.

32. Пономарев Г. В. Перспективы создания фотосенсибилизаторов на основе природного хлорофилла А / Г. В. Пономарев // Российский терапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 148–155.

33. Photodynamic activity of hematoporphyrin conjugates with gold nanoparticles: experiments in vitro / N. F. Gamaleia [et al.] // Experimental Oncology. – 2010. – Vol. 32, N°1. – P. 44–47.

34. Олюшин В. Е. Новый способ фотодинамической терапии в комплексном лечении глиальных опухолей головного мозга / В. Е. Олюшин, А. В. Комфорт, А. Ю. Улитин // Российский терапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 66–85.

35. Створення та експериментальна апробація нового антитіло-кон'югованого сенсибілізатора для фотодинамічної терапії пухлин / М. Ф.

Гамалія [та ін.] // Фотобіологія та фотомедицина. – 2007. – Т. 5, № 1–2. – С. 76–82.

36. Новые отечественные борсодержащие фотосенсибилизаторы для противоопухолевой терапии / М. А. Каплан [и др.] // Российский терапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 42–53.

37. Новые карборанилпорфины на основе 2-формил-5, 10, 15, 20-тетрафенилпорфирина и функциональнозамещенных о- и м-карборанов: синтез и биологические свойства / В. А. Ольшевская [и др.] // Доклады Академии наук. – 2007. – Т. 414, N 2. – С. 199–203.

38. Синтез и исследование структуры феррожидкостей с порфиринами и перспективы их применения в фотодинамической терапии / Ю. В. Кульвелис [и др.] // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2009. – № 5. – С. 55–62.

39. Структура магнитоуправляемых наноразмерных носителей сенсибилизатора фотодитазина по данным малоуглового рассеяния нейтронов / Ю. В. Кульвелис [и др.] // Физика твердого тела. – 2010. – Т. 52, Вып. 5. – С. 974–978.

40. Новые методы создания борсодержащих соединений для адресной доставки бора в клетки опухолей / К. Ю. Жижин [и др.] // Рос. биотерапевт. журнал. – 2010. – №3. – С.10–11.

41. Исследование наноразмерного гидроксиапатита на модели in vitro / А. В. Князев [и др.] // Вестник нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. – 2012, № 5 (1). – С. 88–94.

42. Перспективы создания наноразмерных лекарственных средств для бинарной лучевой терапии злокачественных образований / В. Н. Кулаков [и др.] // Рос. биотерапевт. журнал. – 2010. – № 3. – С.15–16.

43. Нанокристаллические сцинтилляторы для противоопухолей терапии / Н. В. Классен [и др.] // Российский терапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 17–22.

44. Xuejuan, Гао[1] и Da Xing J. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation [Electronic resource] / Journal of Biomedical Science. – 2009. – Vol. 16, N 4. – Avaliable from: 10.1186/1423-0127-16-4 PMCID: PMC2644974.

45. Синтез и исследование структуры феррожидкостей с порфиринами и перспективы их применения в фотодинамической терапии / Ю. В. Кульвелис [и др.] // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2009. – № 5. – С. 55–62.

46. L-929 (NCTC-klone929, CloneofstrainL) (Connective tissue, mouse) (21 грудня) 2009 [Electronic resource] . – Avaliable from: http://www.viromed.com/services/product/l929.htm.

47. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / под общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. – М. : «Спутник+», 2009. – 656 с.

48. Дослідження апоптозу у радіаційній імунології : методичні рекомендації / ДУ «Науковий центр радіаційної медицини АМН України». – Київ, 2010. – 27 с.

49. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Exel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. − 2-е изд. − К.: МОРИОН, 2001. − 408 с.

50. Владимирская Е. Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия / Е. Б. Владимирская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 11. – С. 25–32.

51. Матышевская О. П. Биохимические аспекты вызванного радиацией апоптоза / О. П. Матышевская // Укр. биохим. журн. – 1998. – Т. 70, № 5. – С. 15–29.

52. Москвин С. В. Системный анализ эффективности управления биологическими системами низкоэнергетическим лазерным излучением : Автореф. дисс. … докт. биол.наук: / Москвин Сергей Владимирович. – Тула, 2008. – 38 с.

53. Борисов Г. И. Теоретические и экспериментальные физические методы нейтронно-захватной терапии / Г. И. Борисов // Физика элементар. частиц и атом. ядра. – 2011. – № 5. – С.1371–1479.

54. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects / R. F. Barth, J. A. Coderre, M. G. Vicente [et al.] // Clin. Cancer. Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 3987–4002.

55. Стратонников А. А. К вопросу о дозиметри при фотодинамической терапии: свет, фотосенсибилизатор, кислород / А. А. Стратонников // Российский терапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 31–39.