

Г. Й. Лавренчук<sup>1</sup>, Ю. Б. Шевченко<sup>2</sup>, В. В. Тришин<sup>2</sup>, В. А. Лібман<sup>2</sup>,  
І. В. Козловська<sup>1</sup>, Д. Д. Гапеєнко<sup>1</sup>, Я. В. Пшеничний<sup>2</sup>, В. М. Венедиктов<sup>2</sup>, Ю. С. Іванов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ

<sup>2</sup> Інститут ядерних досліджень НАН України, Київ

<sup>3</sup> Головна астрономічна обсерваторія НАН України, Київ

## КОМБІНОВАНИЙ ВПЛИВ ТЕПЛОВИХ НЕЙТРОНІВ, ГАММА-КВАНТІВ, СВІТЛА ЧЕРВОНОГО ДІАПАЗОНУ ТА НЕЙТРОНОЗАХВАТНИХ АГЕНТІВ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ КЛІТИН ЛІНІЇ L<sub>929</sub> *IN VITRO*

Досліджено комбінований вплив нейтронного, гамма- та світлового (червоного діапазону) опромінення на морфофункціональні зміни в культурі клітин. Виявлено, що в присутності нейтронозахватних агентів із фотосенсибілізуючими властивостями з молекулярною і наноструктурою спільне нейтронне та світлове опромінення викликало до 93 % загибелі проліферуючих клітин *in vitro*.

**Ключові слова:** культура проліферуючих клітин, теплові нейтрони, світло червоного діапазону, виживання, апоптоз.

### Вступ

Нейтронозахватна терапія (НЗТ) є перспективним методом лікування пухлин, які погано піддаються лікуванню традиційними методами [1 - 4]. Принцип дії полягає в наступному: при зіткненні теплових потоків нейтронів з атомами препаратів, що володіють великим перерізом їхнього захоплення (бор-10, гадолій-157) та вибірково накопичуються в пухлинних клітинах, відбувається ядерна реакція і вивільнення великої кількості енергії.

Починаючи з 50-х років минулого століття – часу перших спроб клінічної реалізації НЗТ за допомогою з'єднань бору, проблема селективної доставки <sup>10</sup>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 боркапнат або борний сульфгідрил (BSH) і L-борфенілаланін (BPA) [5]. 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 у реальному масштабі часу і розробки нових селективних туморотропних носіїв пошкоджуючих агентів. Однак за такого підходу виникає проблема токсичності таких нейтронозахватних агентів (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), у результаті якої утворюються цито-

токсичні агенти (синглетний кисень і вільні радикали), що вражають клітинні елементи пухлинної тканини [6 - 10]. Останніми роками в кількох лабораторіях світу синтезовано сполуки, які об'єднують властивості НЗА для НЗТ і фотосенсибілізаторів для ФДТ, зокрема кон'югати похідних хлорофілу А і бактеріохлорофілу А з поліедричними сполуками бору, які підвищують селективність бор-нейтронозахватної терапії (БНЗТ) [11 - 16], роблячи можливою комбіновану ФДТ і БНЗТ раку.

Водночас серед нових напрямків світового технологічного прогресу в медицині першочергової уваги заслуговують нанотехнології. Сучасні уявлення про молекулярно-біологічні зміни в клітинах і можливості новітніх технологій, пов'язаних із використанням наноматеріалів, корінним чином змінили стратегію вирішення найбільш гострих проблем онкології, у першу чергу лікарської резистентності пухлин до цитостатиків [17 - 20].

Загальновідомо, що при онкологічному процесі спостерігається підвищений рівень синтезу білків, через що виникає потреба в доставці до пухлини додаткової кількості різних компонентів, зокрема іонів заліза. Найбільш перспективною формою заліза для конструювання нанокомпозитів вважаються феромагнітні рідини, які містять наночастинки магнетиту – оксиду заліза (II, III) – розмірами від 15 до 75 нм. Зовнішнє управління нанокомпозитами на основі феромагнетика може здійснюватися постійним, змінним, імпульсним і комбінованим магнітним полем, яке забезпечує не тільки таргетну доставку лікарського засобу, але і пролонговану його дію і повільне вивільнення з пухлини [15, 17].

© Г. Й. Лавренчук, Ю. Б. Шевченко, В. В. Тришин, В. А. Лібман, І. В. Козловська, Д. Д. Гапеєнко, Я. В. Пшеничний, В. М. Венедиктов, Ю. С. Іванов, 2016

Усе вищезазначене визначило мету науково-дослідної роботи: дослідити біологічну ефективність комбінованого впливу теплових нейтронів, світла червоного діапазону та НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями в експериментальній моделі пухлинного росту – культурі клітин ссавців. Для досягнення мети необхідно було вирішити такі завдання:

1) дослідити комбінований вплив теплових нейтронів, світла червоного діапазону та НЗА з молекулярною та наноструктурою на життєздатність клітин експериментальної моделі пухлинного росту;

2) вивчити морфофункціональні характеристики культури фібробластоподібних клітин (структура популяції, проліферативна та мітотична активність, апоптоз) при дії різних доз гамма-випромінювання  $^{60}\text{Co}$  (вклад гамма-компоненти), світла червоного діапазону та НЗА з молекулярною структурою і магнітокерованих наноконструкцій;

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

### Матеріали та методи

Експериментальні дослідження виконано на культурі проліферуючих клітин лінії L<sub>929</sub>, яка морфологічно є фібробластоподібною [21]. Клітини культивували в повному поживному середовищі RPMI-1640, що містило 4 ммоль/л L-глутаміну, 10 % ембріональної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину при постійній температурі 37 °C згідно зі стандартними методами роботи з клітинними штабами. Клітини вирощували на покривних скельцях розмірами 16 × 8 мм, що знаходилися на дні скляних пляшечок, до конфлюентного стану моношару (1 - 6 діб).

**Інкубація клітин із НЗА.** У дослідженнях були використані як молекулярні НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями, такі як водорозчинні солі 1-карба-клозо-додекарборат цезію (молекулярна маса 278 мг) – реагент А та {5,10,15,20-тетракис[*n*-(1'-карба-клозо-додекарборан-1'-іл)тетрафторфеніл]17,18-дигідропорфірин}натрію (молекулярна маса 1565 мг) – реагент Б, так і магнітокеровані наноконструкції, синтезовані із солей заліза з додаванням нітрату гадолінію. У реагенті 1 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС/ДТПК-Gd}$ ) на поверхню магнетиту, модифікованого функціональними аміногрупами, хімічно закріпили діетилентриамінпентаоцтову кислоту, а в реагенті 2 проведено модифікацію поверхні мезо-2,3-димеркаптосукциновою кислотою ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ДМСК-}$

Gd), яка зв'язується з гідроксильною групою поверхні магнетиту; гадоліній адсорбували з розчину сульфату гадолінію. Реагент 3 додатково модифікували гідроксиапатитом ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/2\text{Gd}_2\text{O}_3/\text{ГА}$ ), реагент 4 – атомом бору –  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GdBO}_3$ . Методами рентгеноструктурного аналізу, рентгенівської фотоелектронної спектроскопії, електронної мікроскопії колоїди охарактеризовані як полідисперсії, що складаються з частинок розмірами від 2 до 22 нм (при максимальному вмісті фракції ~ 7,5 нм).

Усі НЗА додавали в культуральне середовище через 24 год після посадки клітин (щоб вони не впливали на адгезію та розпластання клітин на скляній підкладці). У попередніх дослідженнях експериментально було встановлено межі цитотоксичності кожного реагента окремо та у поєднанні з червоним світлом (область дослідження концентрацій становила 0,05 - 500 мкг/мл). Грунтуючись на результатах цих експериментів, було вибрано концентрацію реагентів 5 мкг/мл як таку, яка є нешкідливою для всіх варіантів дослідів.

НЗА з молекулярною структурою (речовини А і Б) додавали у вигляді водного розчину. Наноконструкції на основі фериту, які мали дрібнодиспергований ультразвукостан, додавали до клітин у концентрації 5 мкг/мл. Культивування клітин у присутності НЗА здійснювали впродовж 5 діб.

**Опромінення клітин тепловими нейтронами** проводили на горизонтальному каналі для біологічних досліджень на атомному реакторі ВВР-М Інституту ядерних досліджень НАН України в термостатованій камері із світлодіодами через 24 год після введення в поживне середовище з клітинами НЗА (молекулярних та наноконструктив). Доза опромінення за розрахунками становила 1 Гр. Розрахунок дози проводили методом Монте-Карло за допомогою програми MCNP4. Враховували елементний склад клітин, сенсibilізаторів (за винятком бору). У програму вводився середній потік нейтронів  $P_{\text{тн}} = 10^8$  н/с /см<sup>2</sup>.

**Опромінення клітин червоним світлом** проводили в автоматичному режимі одночасно з нейтронами через 24 год після введення в поживне середовище культури клітин НЗА в дозі 60 Дж/см<sup>2</sup> (100 мВт/см<sup>2</sup> × 600 с) на експериментальній установці, розробленій в Інституті ядерних досліджень НАН України для одночасного або послідовного опромінення культур клітин червоним світлом (630 нм) від світлодіодів при постійній температурі 37 °C.

**Опромінення культур клітин гамма-квантами** здійснювали на апараті «Тератрон» (Канада) (джерело –  $^{60}\text{Co}$  з енергією гамма-квантів 1,2 МеВ, потужність експозиційної дози

$4,3 \cdot 10^{-4}$  Кл/(кг·с), відстань до об'єкта 80 см, доза опромінення 1 Гр) через 48 год після посадки та 24 год після додавання до поживного середовища НЗА. Через 1 год дослідні культури клітин опромінювали світлом червоного спектра на експериментальній установці зі світлодіодами в дозі  $60 \text{ Дж/см}^2$  ( $100 \text{ мВт/см}^2 \times 600 \text{ с}$ ).

**Методи оцінки життєздатності клітин у культурі.** Морфофункціональні зміни в культурі клітин оцінювали в різні терміни культивування клітин за загальноприйнятими показниками життєздатності: проліферативна та мітотична активність і кількість гігантських багатоядерних клітин. Проліферативну активність клітин оцінювали за кінетикою росту. Упродовж 5 діб, щоденно, готували препарати: фіксували  $96^\circ$  етанолом та фарбували гематоксилін-еозином. На предметне скло препарати з пофарбованими клітинами наклеювали канадським бальзамом. Під оптичним мікроскопом «Axioscop» (West Germany) при збільшенні в 1000 разів у межах сітки 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 полікаріоцитів розраховувався на 1000 клітин (%). Фото отримано за допомогою цифрової камери DIGITAL CAMERA for Microscope ScienceLab DCM320(USB 2.0), Resolution 3.5 Mpixels.

**Визначення кількості апоптичних клітин у культурах.** У тих же культурах клітин, в яких досліджували їхнє виживання, 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  $14,4 \text{ мг Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $12 \text{ г KH}_2\text{PO}_4$ ,  $40 \text{ г NaCl}$ ,  $1 \text{ г KCl}$ ,  $1 \text{ г}$  азиду натрію), 10 хв витримували в розчині Версена для відкріплення їх від скла, потім заміщували його ЗФР, ресуспендували. 1 мл суспензії клітин центрифугували у ЗФР ( $1500 \text{ об/хв}$  протягом 5 хв), супернатант зливали. Процедуру відмивання повторювали 3 рази. Потім до осаду у пробірку додавали 1 мл розчину пропідію йодиду ( $5 \text{ мг PI}$ ,  $0,1\%$  цитрату натрію та  $0,1\%$  Triton X-100) та інкубували протягом 1 год при температурі  $4^\circ\text{C}$ . Аналізували клітини на протоковому цитофлюориметрі FACStar Plus фірми "Becton Dickinson" (США). Апоптоз фіксували по гіподиплоїдному ДНК-піку, який чітко відділявся від нормального (диплоїдного) ДНК-піку. Оцінювали червону флуоресценцію (канал FL-2) пропідію йодиду з довжиною хвилі  $\lambda 595 \text{ нм}$  не менш ніж для 10000 клітин [22].

Статистичний аналіз вірогідності отриманих даних проводили за допомогою t-критерію

Стьюдента [23], використовуючи комп'ютерні програми Microsoft Excel та Biostat з попередньою перевіркою гіпотези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова – Смірнова.

При виконанні експериментальних досліджень було проаналізовано 894 препарата культур клітин.

## Результати та обговорення

Результати експериментального дослідження в 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  $60 \text{ Дж/см}^2$  (питома потужність дози  $100 \text{ мВт}$ , експозиція 10 хв) спільно з молекулярними борвмісними НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями 1-карба-клозо-додекарборат цезію – реагент А та {5,10,15,20-тетракіс[n-(1'-карба-клозо-додекарборан-1'-іл)тетрафторфеніл]17,18-дигідропор-фірин}натрію – реагент Б представлені на рис.1 та 2. Було показано, що опромінення клітин нейтронами статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) викликало загибель 30 % клітин. Застосування НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями (реагент А – карборан чи реагент Б – порфірин) інактивувало ще 35 % клітин. Насамкінець застосування червоного світла в комплексі з нейтронами і НЗА призводило до загибелі від 85 до 93 % клітин. Мітотична активність у культурі клітин за цих умов інгібувалась у 2 - 2,5 раза, водночас кількість атипичних багатоядерних клітин зростала майже у 5 разів. Слід відзначити, що за нейтронного опромінення в культурі клітин спостерігали полікаріоцити з великою кількістю ядер (6 - 8) (див. рис. 2, 4 та 6). Зазвичай у злоякісних тканинах появу полікаріоцитів (дво- чи триядерних) описують як наслідок порушень мітозу на різних стадіях та/або проліферативної активності клітин у процесі злоякісної трансформації. Нейтронне опромінення клітин призводило до появи клітин зі значно більшою кількістю ядер різного розміру, що вказує на радіогенний механізм пошкодження ДНК клітин переважно шляхом двониткових розривів та гальмування процесів їхньої репарації [24].

Структурні зміни в культурі проліферуючих клітин за нейтронного опромінення в дозі 1 Гр характеризувались появою значної кількості атипичних багатоядерних клітин (див. рис. 2, а), клітин з мікроядрами та апоптотичних клітин. Опромінення таких клітин червоним світлом призвело до появи нежиттєздатних трьо- та багатополосних мітозів (див. рис. 2, б). Інкубація клітин з реагентом А за нейтронного опромі-

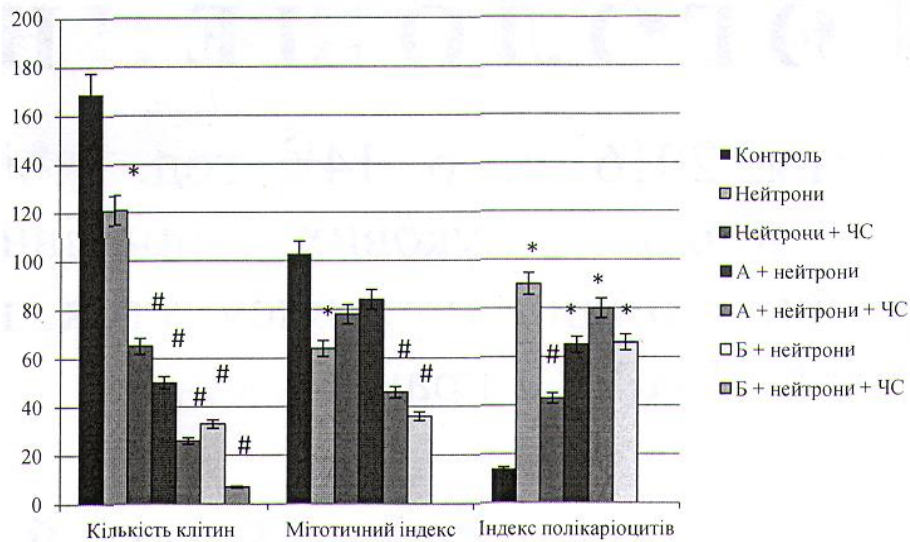


Рис. 1. Показники життєздатності клітин лінії  $L_{929}$  на 5-у добу культивування після опромінення тепловими нейтронами в дозі 1 Гр та в поєднанні з червоним світлом від світлодіодів і молекулярними НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями (реагенти А і Б) у концентрації 5 мкг/мл. Позначення на рисунку: ЧС – червоне світло; А – реагент А, Б – реагент Б. На осі ординат – кількість клітин на площі препарату 0,05 мм<sup>2</sup>, мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів, %.

\* Відмінності достовірні в порівнянні з контролем,  $p < 0,05$ .

# Відмінності достовірні в порівнянні з опроміненням нейтронами,  $p < 0,05$ .

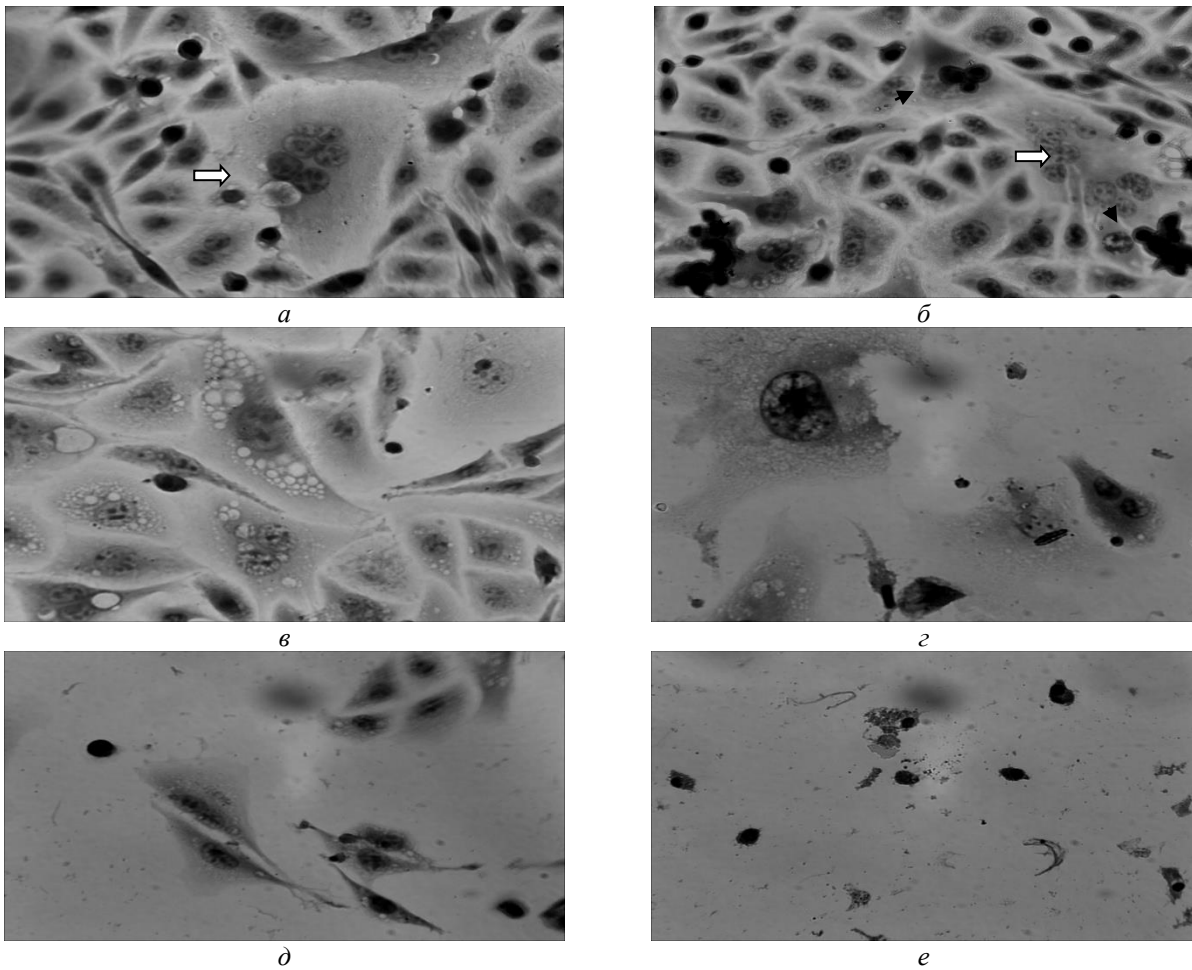


Рис. 2. Структура популяції клітин лінії  $L_{929}$  на 5-у добу в контролі (а), після опромінення нейтронами спектра поділу в дозі 1 Гр (б) та при поєднаній дії нейтронів у дозі 1 Гр і НЗА (реагенту А (в) та реагенту Б (д)) у концентрації 5 мкг/мл, а також за дії нейтронів, червоного світла та НЗА: реагент А (е), реагент Б (ф). Стрілками позначено гігантські багатоядерні клітини – полікаріоцити. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення  $\times 1000$ .

нення викликала гіпервакуолізацію цитоплазми, утворення значної кількості клітин із мікроядрами та посилювала апоптоз. Додаткова дія червоного світла призводила до істотних деструктивних проявів у культурі клітин, до їхньої загибелі. Ще більш негативні наслідки спостерігались при застосуванні реагенту Б – відбувалась повна деструкція моношару клітин.

Як показали дослідження, магнітокеровані гадолінійвмісні наноккомпозити на основі магнетиту, модифіковані  $\gamma$ -АПС/ДТПК (реагент 1) та ДМСК (реагент 2), можуть бути ефективними НЗА при опроміненні нейтронами та світлом червоного діапазону. Загалом вони виявились малотоксичними, але за опромінення монохро-

матичними червоним світлом показали високу ефективність в якості фотосенсибілізаторів.

Застосування цих реагентів як НЗА, тобто за опромінення нейтронами, показало, що ефективність їх відрізняється: реагент 1 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). Для реагенту 2 ці показники становили 68 % від контролю та 17 % порівняно з опроміненням нейтронами та червоним світлом. Водночас пригнічувалась мітотична активність клітин, а кількість полікаріоцитів була значна, хоча й менша за показники нейтронного опромінення.

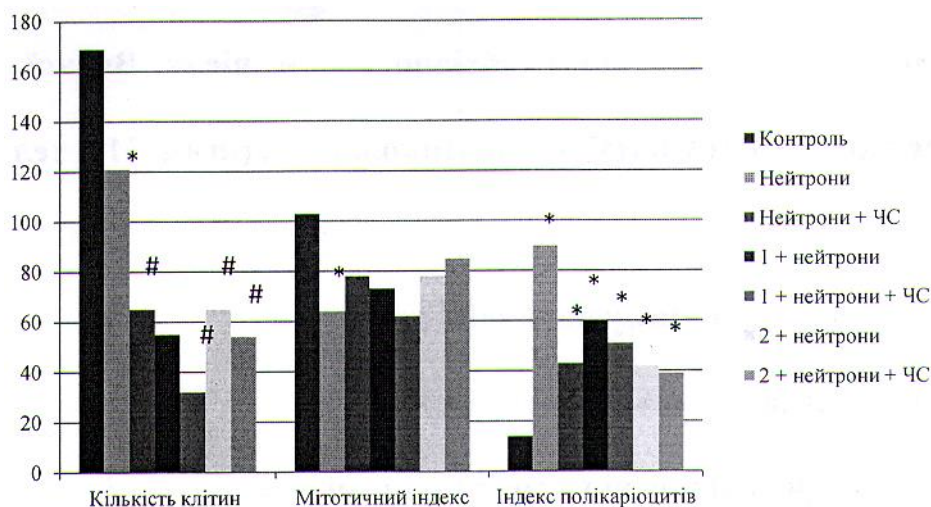


Рис. 3. Показники життєздатності клітин лінії L<sub>929</sub> на 5-у добу культивування після опромінення тепловими нейтронами в дозі 1 Гр та у поєднанні з червоним світлом від світлодіодів і гадолінійвмісними наноккомпозитами (реагенти 1 і 2) у концентрації 5 мкг/мл. Позначення на рисунку: ЧС – червоне світло; 1 – реагент 1; 2 – реагент 2. На осі ординат – кількість клітин на площі препарату 0,05 мм<sup>2</sup>, мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів, %.

\* Відмінності достовірні в порівнянні з контролем,  $p < 0,05$ .

# Відмінності достовірні в порівнянні з опроміненням тепловими нейтронами,  $p < 0,05$ .

Структурні зміни в популяції клітин теж були досить помітні (рис. 4), але не настільки деструктивні, як за молекулярних НЗА: у культурі спостерігали гігантські багатоядерні клітини, характерні для нейтронного опромінення, апоптотичні тільця та вакуолізацію цитоплазми, істотне зменшення щільності моношару клітин.

Аналіз отриманих результатів указує на недостатню фотосенсибілізуючу складову досліджуваних наноккомпозитів або на недостатній фотодинамічний ефект світлодіодів експериментальної камери, розробленої для досліджень на атомному реакторі.

Дослідження ефективності магніточутливого гадолінійвмісного наноккомпозиту, модифікованого гідроксиапатитом – реагентом 3 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/2Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/ГА) за комбінованого впливу теплових нейтронів і світла червоного діапазону, виявило (рис. 5 та 6, а, б) домінуючу роль у клі-

тинних реакціях нейтронного опромінення.

Завдяки двом молекулам гадолінію-157 біологічна ефективність наноккомпозиту висока: за поєднаної дії нейтронів і червоного світла вижило тільки 17 % клітин, мітотична активність у культурі клітин була низькою, однак відзначали багато полікаріоцитів із характерною для нейтронів підвищеною кількістю ядер і мікроядер. Слід відзначити, що за цих умов змінювались форма клітин, ядерно-цитоплазматичне співвідношення та спостерігалась вакуолізація цитоплазми (див. рис. 6, а, б).

Наявність атома бору-10 у гадолінійвмісному наноккомпозиті реагенту 4 не сприяла підвищенню ушкоджуючої дії на клітини нейтронного опромінення (див. рис. 5). Додаткове опромінення дослідних культур клітин світлом червоного діапазону вдвічі збільшило загибель клітин та блокувало їхній поділ, що призвело до деструкції моношару (див. рис. 6, в, г).



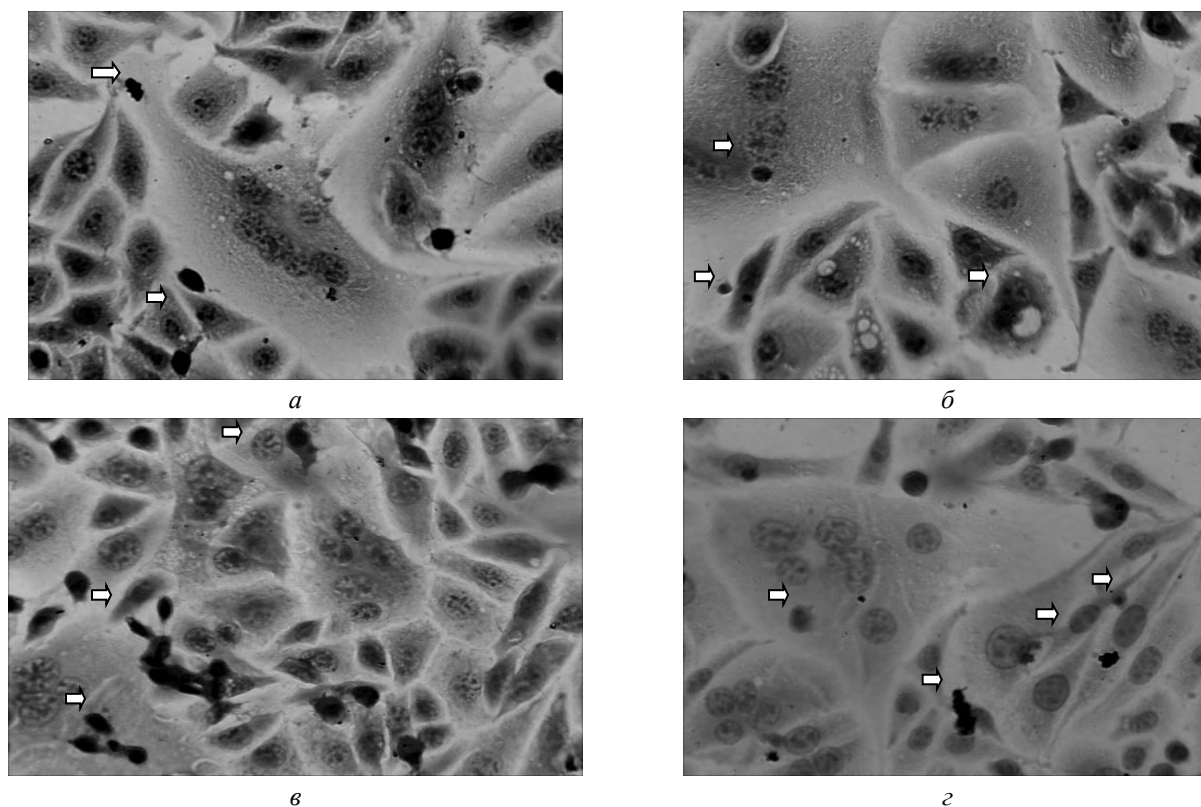


Рис. 4. Структура популяції клітин лінії  $L_{929}$  на 5-у добу за комбінованого впливу нейтронів, реагентів 1 (а) та 2 (в) у концентрації 5 мкг/мл та червоного світла (б) і (г). Стрілками позначено апоптотичні клітини. Пофарбування гематоксилином та еозином. Збільшення  $\times 1000$ .

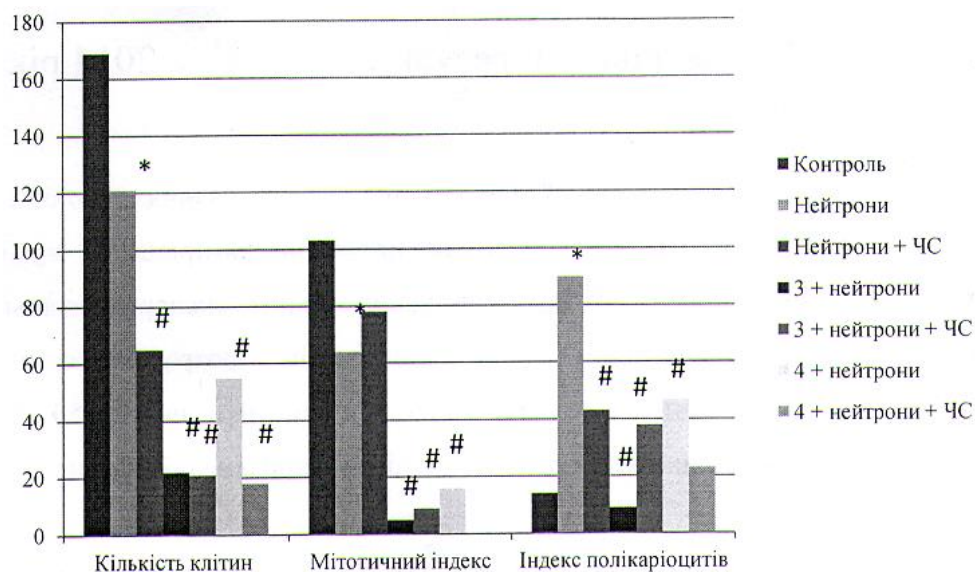


Рис. 5. Показники життєздатності клітин лінії  $L_{929}$  на 5-у добу культивування після опромінення нейтронами в дозі 1 Гр та в поєднанні з червоним світлом від світлодіодів і гадолінійвмісним нанокompatитом, модифікованим гідроксиапатитом (реагент 3) та бор-гадолінійвмісним нанокompatитом (реагент 4) у концентрації 5 мкг/мл. Позначення на рисунку: ЧС – червоне світло; 3 – реагент 3; 4 – реагент 4. На осі ординат – кількість клітин на площі препарату  $0,05 \text{ мм}^2$ , мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів, %.

\* Відмінності достовірні в порівнянні з контролем,  $p < 0,05$ .

# Відмінності достовірні в порівнянні з опроміненням нейтронами,  $p < 0,05$ .

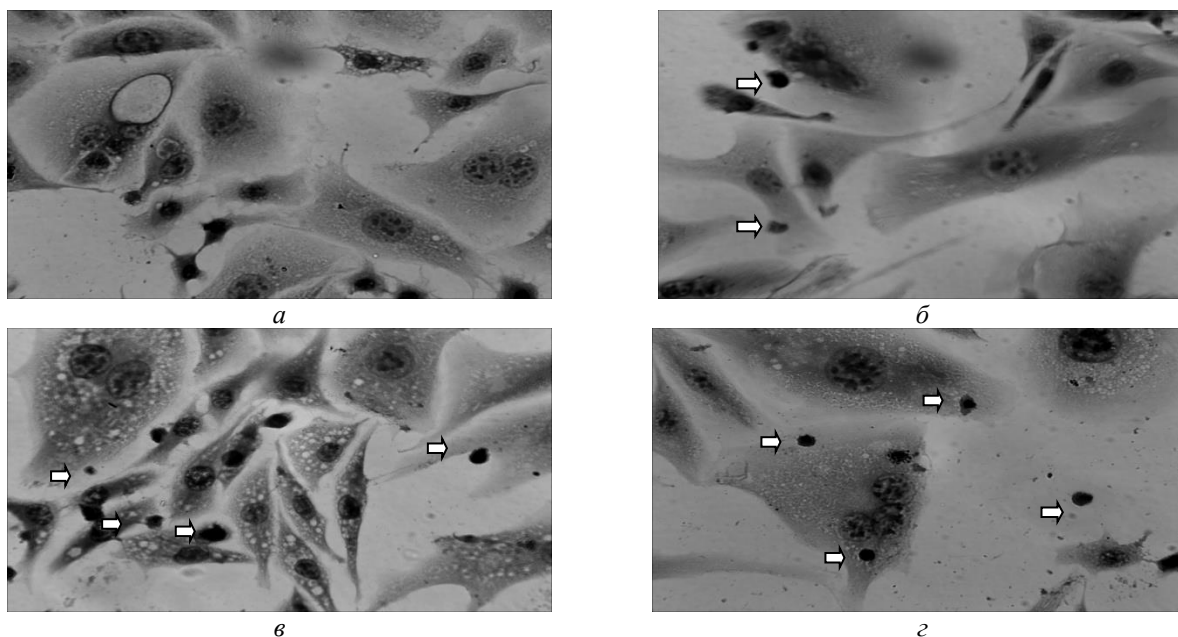


Рис. 6. Структура популяції клітин лінії L<sub>929</sub> на 5-у добу за комбінованого впливу нейтронів спектра поділу, реагентів 3 (а) та 4 (в) у концентрації 5 мкг/мл та червоного світла (б) і (г). Стрілками позначено апоптотичні клітини. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення × 1000.

Визначення кількості клітин на стадії апоптозу показало, що комбінований вплив нейтронного та світлового опромінення в поєднанні з НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями індуку-

вали в культурі клітин апоптоз, величина якого у 4 - 5 разів перевищувала контроль та у 2 - 3 рази опромінення окремо нейтронами чи світлом червоного діапазону (рис. 7).

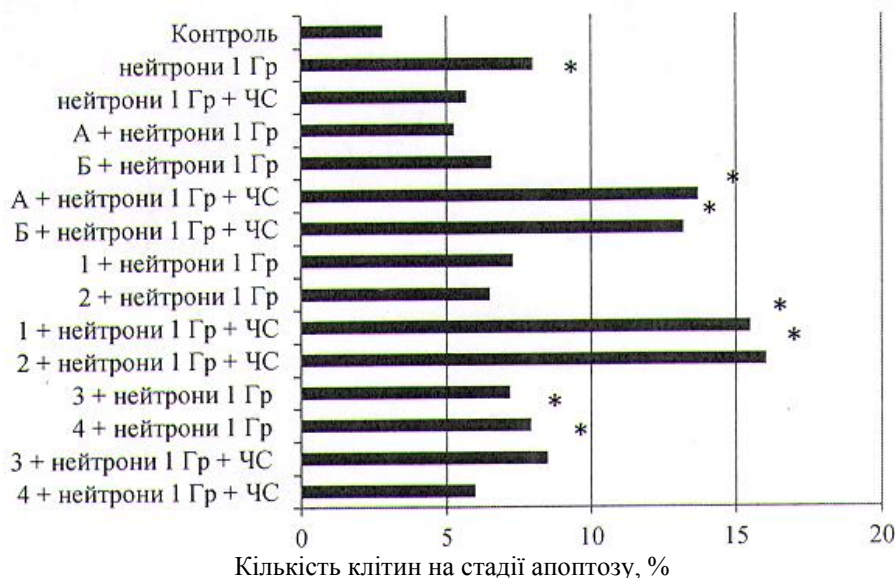


Рис. 7. Апоптоз у культурі клітин лінії L<sub>929</sub> на 5-у добу інкубації з НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями після опромінення тепловими нейтронами в дозі 1 Гр та червоним світлом світлодіодів експериментальної термостатованої камери в дозі 60 Дж/см<sup>2</sup> (питома потужність дози 100 мВт/см<sup>2</sup>, експозиція 10 хв). Позначення на рисунку: ЧС – опромінення світлом червоного діапазону; А – 1-карба-клозо-додекарборат цезію; Б – {5,10,15,20-тетракис[*n*-(1'-карба-клозо-додекарборан-1'-іл)тетрафторфеніл]17,18-дигідропорфірин}натрію; 1 – наноккомпозит Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/γ-АПС/ДТРА-Gd; 2 – наноккомпозит Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ДМСК/Gd; 3 – наноккомпозит Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/2Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/ГА; 4 – наноккомпозит Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GdBO<sub>3</sub>.

\* Відмінності достовірні в порівнянні з контролем, p < 0,05.

Відомо, що в результаті поглинання нейтрона бором-10 утворюється збуджене ядро бору-11, яке за 10<sup>-12</sup> с розпадається на ядро літію-7 і альфа-частинку, що розлітаються з великою енергі-

єю. У 6 % випадків сумарна енергія становить – 2,8 МеВ, а в 94 % – 2,3 МеВ, оскільки 0,48 МеВ виноситься гамма-квантами. Ці заряджені частинки швидко гальмуються: ядро літію на довжині

5 мкм, альфа-частинка – на 7 мкм. Знаючи що розмір клітини близько 10 мкм, видно, що 80 % енергії ядерної реакції виділяється саме в тій клітині, яка містила ядро бору, що поглинуло нейтрон. Як же впливає на клітини 20 % енергії випромінювання від гамма-квантів? За літературними даними [3] саме гамма-випромінювання може негативно впливати на нормальні клітини, що оточують пухлину.

Проведені експериментальні дослідження дали змогу оцінити вклад гамма-опромінення в клітинній реакції за умов впливу червоного світла та НЗА з молекулярною і наноструктурою.

На рис. 8 представлено дозову залежність показників життєздатності клітин лінії L<sub>929</sub> у термінальний період культивування при поєднаній дії гамма-випромінювання <sup>60</sup>Co в дозах 1, 5 та 10 Гр

і червоного світла світлодіодів у дозі 60 Дж/см<sup>2</sup>. Видно, що поєднаний вплив гамма-опромінення в дозі 1 Гр і червоного світла вдвічі зменшує виживання клітин у моношарових культурах та їхню мітотичну здатність порівняно з контролем. Підвищення дози радіації до рівня сублетальних 5 і 10 Гр зменшує кількість клітин, що вижили, до рівня 18 %. Зрозуміло, що за нейтронного опромінення, враховуючи експозицію, мало ймовірно, що будуть формуватись сублетальні дози, але внесок гамма-опромінення необхідно буде враховувати.

Застосування НЗА з молекулярною та наноструктурою (рис. 9) статистично достовірно не змінюють показники життєздатності клітин у тест-системі *in vitro* у порівнянні тільки з гамма-опроміненням.

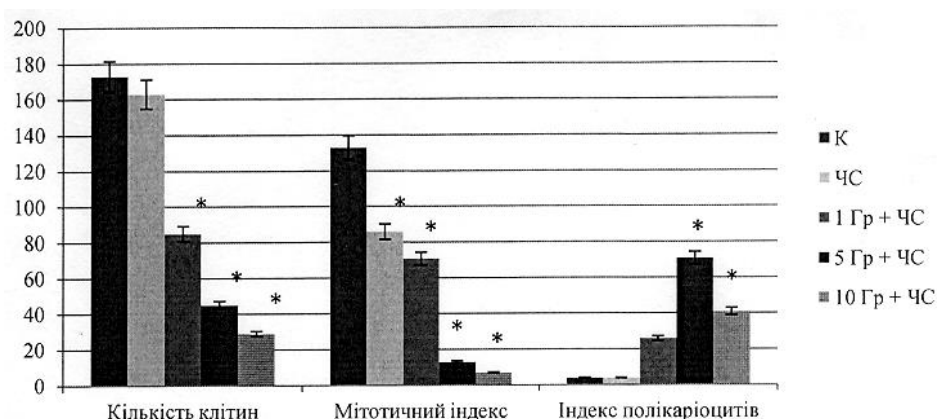


Рис. 8. Дозова залежність показників життєздатності клітин лінії L<sub>929</sub> на 5-у добу культивування за умов поєднаного впливу гамма-радіації і світла червоного діапазону від світлодіодів експериментальної термостатованої камери в дозі 60 Дж/см<sup>2</sup> (питома потужність дози 100 мВт/см<sup>2</sup>, експозиція 10 хв). Позначення на рисунку: К – інтактні клітини; ЧС – опромінені світлом червоного діапазону. На осі ординат – кількість клітин на площі препарату 0,05 мм<sup>2</sup>, мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів, %.

\* Відмінності достовірні в порівнянні з контролем,  $p < 0,05$ .

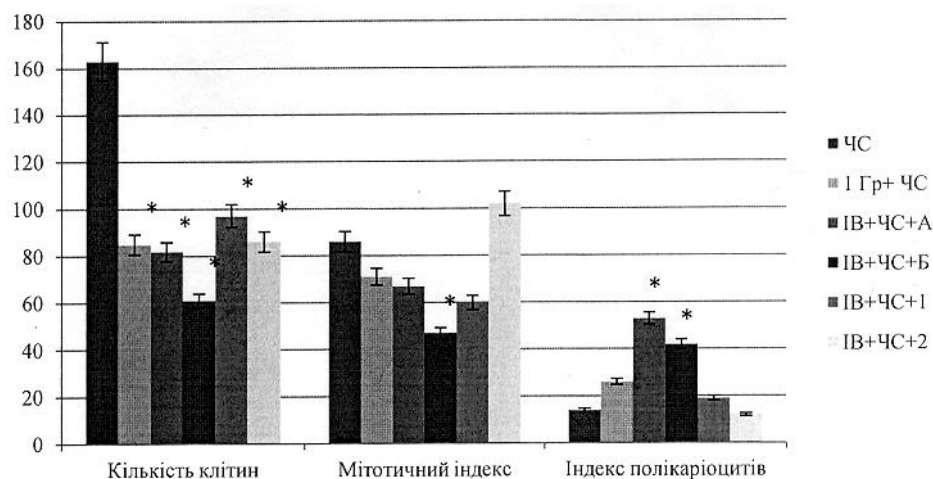


Рис. 9. Показники життєздатності клітин лінії L<sub>929</sub> на 5-у добу культивування за умов поєднаного впливу гамма-радіації в дозі 1 Гр, світла червоного діапазону від світлодіодів експериментальної термостатованої камери в дозі 60 Дж/см<sup>2</sup> (питома потужність дози 100 мВт/см<sup>2</sup>, експозиція 10 хв) та НЗА: реагентів з молекулярною структурою (реагенти А та Б) і нанокompatивів – реагентів 1 та 2 в концентрації 5 мкг/мл. Позначення на рисунку: ЧС – клітини, опромінені світлом червоного діапазону; ІВ – гамма-опромінення в дозі 1 Гр. На осі ординат – кількість клітин на площі препарату 0,05 мм<sup>2</sup>, мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів, %.

\* Відмінності достовірні в порівнянні із світлом червоного діапазону,  $p < 0,05$ .



Аналіз апоптозу, що індукувався в культурі клітин за поєднаного впливу НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями, гамма-квантів  $^{60}\text{Co}$  у різних дозах та світла червоного діапазону показав (рис. 10), що кількість апоптотичних клітин статистично достовірно зростала ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з інтактними клітинами у тих культурах клітин, що опромінювали червоним світлом спільно з НЗА, після гамма-опромінення зі збіль-

шенням дози радіації та за поєднаної дії НЗА, червоного світла та гамма-квантів  $^{60}\text{Co}$ . Водночас не виявили статистично достовірної різниці в індукції апоптозу в таких варіантах досліджу: НЗА, червоне світло та радіація в порівнянні з гамма-опроміненням у дозах 5 та 10 Гр. Отже, загибель клітин детермінується опроміненням у сублетальних дозах, а не червоним світлом чи НЗА з молекулярною чи наноструктурою.

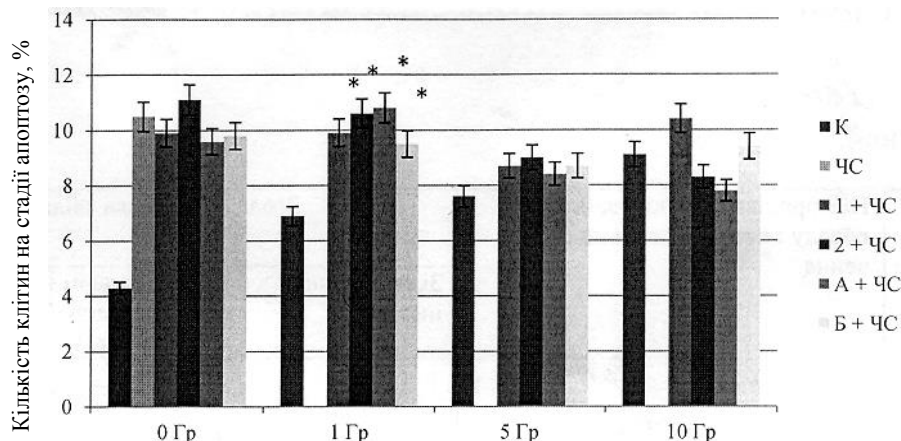


Рис. 10. Апоптоз у культурі клітин лінії L929 на 5-у добу інкубації з НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями після опромінення гамма-квантами  $^{60}\text{Co}$  та червоним світлом світлодіодів експериментальної термостатованої камери в дозі 60 Дж/см<sup>2</sup> (питома потужність дози 100 мВт/см<sup>2</sup>, експозиція 10 хв). Позначення на рисунку: К – інтактні клітини; ЧС – опромінення світлом червоного діапазону; 1 – наноккомпозит Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/γ-АПС/ДТРА-Gd; 2 – наноккомпозит Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ДМСК/Gd; А – 1-карба-клозо-додекарборат цезію; Б – {5,10,15,20-тетраакис[n-(1'-карба-клозо-додекарборан-1'-іл)тетра-фторфеніл]17,18-дигідропорфірин} натрію.

\* Відмінності достовірні в порівнянні з гамма-опроміненням,  $p < 0,05$ .

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

### Висновки

За результатами експериментальних досліджень поєднаного впливу теплових нейтронів,

світлового опромінення червоного діапазону та НЗА з фотосенсибілізуючими властивостями на клітини *in vitro* було виявлено особливості морфофункціональних змін у тест-системі культури проліферуючих клітин залежно від типу та структури НЗА (борвмісні молекулярні фотосенсибілізатори чи гадолінійвмісні наноккомплекси на основі магнетиту) і встановлено, що за вищезазначених поєднаних умов (опромінення нейтронами в дозі 1 Гр, червоним світлом 60 Дж/см<sup>2</sup> та НЗА в концентрації 5 мкг/мл) можна досягти до 93 % загибелі проліферуючих клітин, більш ніж у 2,5 раза зменшення мітотичної активності клітин, що вижили. Показано, що внесок гамма-компоненти, яка супроводжує нейтронне опромінення, може впливати на показники життєздатності нормальних клітин за умови перевищення дози гамма-квантів більше 1 Гр.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Куленников Э.Л., Довбня А.Н., Телегин Ю.Н. и др. Пучки нейтронов для терапии: обзор. - Харьков: ННЦ ХФТИ, 2011. - 31 с.
2. Наврузов С.Н. Каххоров Ж.Н., Ходжаева Н.Х. Экспериментальное обоснование нейтрон-захватной терапии на горизонтальном канале исследова-
3. Борисов Г.И. Теоретические и экспериментальные физические методы нейтронно-захватной терапии // Физика элементар. частиц и атом. ядра. - 2011. - тельского атомного реактора ВВР-СМ Института ядерной физики Республики Узбекистан // Арх. клин. эксп. мед. - 2014. - Т. 23, № 1. - С. 20 - 22.

- № 5. - С. 1371 - 1479.
4. Salt C., Lennox A.J., Takagaki M. et al. Boron and gadolinium neutron capture therapy // *Russian Chemical Bulletin*. - 2004. - Vol. 53, Iss. 9. - P. 1871 - 1888.
  5. Баранов А.П., Корякин С.Н., Ульяненко С.Е. и др. Анализ особенностей распределения BSH и ВРА с целью повышения эффективности нейтронозахватной терапии // *Рос. биотерапевт. журн.* - 2007. - Т. 6, № 1. - С. 80.
  6. Гамалея Н.Ф., Куценко В.В. Фотодинамическая терапия - эффективный метод лечения больных со злокачественными опухолями // *Doctor*. - 2003. - Vol. 4. - P. 28 - 31.
  7. Москвин С.В., Буйлин В.А. Основы лазерной терапии. - Тверь: Триада, 2006. - 256 с.
  8. Цыб А.Ф., Каплан М.А. Возможности и перспективы применения фотодинамической терапии (экспериментальные и клинические исследования) // *Рос. мед. вести.* - 2002. - № 3. - С. 19 - 24.
  9. Олюшин В.Е., Комфорт А.В., Улитин А.Ю. Новый способ фотодинамической терапии в комплексном лечении глиальных опухолей головного мозга // *Рос. биотерапевт. журн.* - 2007. - Т. 6, № 1. - С. 23.
  10. Никитина Р.Г., Мардынская В.П., Морозова Т.Г. и др. Способ повышения эффективности лечения меланомы // *Бюл. экспериментальной биологии и медицины.* - 2009. - Т. 148, № 8. - С. 209 - 212.
  11. Evstigneeva R.P., Zaitsev A.V., Luzgina V.N. et al. Carboranylporphyrins for boron neutron capture therapy of cancer // *Current Medicinal Chemistry - Anticancer Agents*. - 2003. - No. 3. - P. 383 - 392.
  12. Ol'shevskaya V.A., Zaitsev A.V., Luzgina V.N. et al. Novel boron containing derivatives of 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin: synthesis and toxicity for drug-resistant tumor cells // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. - 2006. - Vol. 14, No. 1. - P. 109 - 120.
  13. Лисовский М.В., Жданов А.П., Жижин К.Ю., Кузнецов Н.Т. Новый метод получения борсодержащих биологически активных производных для БНЗТ // *Рос. биотерапевт. журн.* - 2007. - Т. 6, № 1. - С. 48.
  14. Каплан М.А., Никитина Р.Г., Ольшевская В.А. и др. Новые отечественные борсодержащие фотосенсибилизаторы для противоопухолевой терапии // *Рос. биотерапевт. журн.* - 2007. - Т. 6, № 1. - С. 16.
  15. Кульвелис Ю.В., Трунов В.А., Лебедев В.Т. и др. Синтез и исследование структуры феррожидкостей с порфиринами и перспективы их применения в фотодинамической терапии // *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования.* - 2009. - № 5. - С. 55 - 62.
  16. Ольшевская В.А., Зайцев А.В., Кононова Е.Г. и др. Новые карборанилпорфины на основе 2-формил-5, 10, 15, 20-тетрафенилпорфирина и функциональнозамещенных о- и м-карборанов: синтез и биологические свойства // *Докл. академии наук.* - 2007. - Т. 414, № 2. - С. 199 - 203.
  17. Кульвелис, Ю.В., Трунов В.А., Лебедев В.Т. и др. Структура магнитоуправляемых наноразмерных носителей сенсбилизатора фотодитазина по данным малоуглового рассеяния нейтронов // *Физика твердого тела.* - 2010. - Т. 52, Вып. 5. - С. 974 - 978.
  18. Князев А.В., Буланов Е.Н., Алейник Д.Я. и др. Исследование наноразмерного гидроксипатита на модели *in vitro* // *Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского.* - 2012. - № 5 (1). - С. 88 - 94.
  19. Кулаков В.Н., Шимановский Н.Л., Панов В.О. и др. Перспективы создания наноразмерных лекарственных средств для бинарной лучевой терапии злокачественных новообразований // *Рос. биотерапевт. журн.* - 2010. - Т. 9, № 3. - С. 15 - 16.
  20. Классен Н.В., Кедров В.В., Кобелев Н.П. и др. Нанокристаллические сцинтилляторы для противоопухолевой терапии // *Рос. биотерапевт. журн.* - 2007. - Т. 6, № 1. - С. 75.
  21. L-929 (NCTC-clone 929, Clone of strain L) (Connective tissue, mouse) (21 December 2009). - URL: <http://www.viromed.com/services/product/1929.htm>
  22. Дослідження апоптозу у радіаційній імунології: методичні рекомендації / ДУ «Науковий центр радіаційної медицини АМН України». - К., 2010. - 27 с.
  23. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. - 2-е изд. - К.: МОРИОН, 2001. - 408 с.
  24. Lavrenchuk H.Yo. Survival and proliferative activity of L-cells exposure to neutrons of different energy // *J. Toxicol. Abstr.* - 1987. - Vol. 10, No. 2. - P. 5 - 6.

Г. И. Лавренчук<sup>1</sup>, Ю. Б. Шевченко<sup>2</sup>, В. В. Тришин<sup>2</sup>, В. А. Либман<sup>2</sup>,  
И. В. Козловская<sup>1</sup>, Д. Д. Гапоненко<sup>1</sup>, Я. В. Пшеничный<sup>2</sup>, В. М. Венедиктов<sup>2</sup>, Ю. С. Иванов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины», Киев

<sup>2</sup> Институт ядерных исследований НАН Украины, Киев

<sup>3</sup> Главная астрономическая обсерватория НАН Украины, Киев

#### КОМБИНИРОВАННОЕ ВЛИЯНИЕ ТЕПЛОВЫХ НЕЙТРОНОВ, ГАММА-КВАНТОВ, СВЕТА КРАСНОГО ДИАПАЗОНА И НЕЙТРОНОЗАХВАТНЫХ АГЕНТОВ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОК ЛИНИИ L<sub>929</sub> *IN VITRO*

Исследовали комбинированное воздействие нейтронного, гамма-облучения и света красного диапазона на морфофункциональные изменения клеток в культуре. Обнаружено, что в присутствии нейтронозахватных агентов с фотосенсибилизирующими свойствами с молекулярной и наноструктурой совместное нейтронное и световое облучение вызывало до 93 % гибели пролиферирующих клеток *in vitro*.

*Ключевые слова:* культура пролиферирующих клеток, тепловые нейтроны, свет красного диапазона, выживаемость, апоптоз.

**H. Yo. Lavrenchuk<sup>1</sup>, Yu. B. Shevchenko<sup>2</sup>, V. V. Tryshyn<sup>2</sup>, V. A. Libman<sup>2</sup>,  
I. V. Kozlovskaya<sup>1</sup>, D. D. Gapeenko<sup>1</sup>, Ya. V. Pshenychnyi<sup>1</sup>, V. M. Venedyktov<sup>2</sup>, Yu. S. Ivanov<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> SI "National Research Center for Radiation Medicine of NAMS of Ukraine", Kyiv

<sup>2</sup> Institute for Nuclear Research, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>3</sup> Main Astronomical Observatory, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

**COMBINED EFFECTS OF THERMAL NEUTRONS, GAMMA RAYS,  
RED BAND LIGHT AND NEUTRON CAPTURE AGENTS  
TO THE MORPHOLOGICAL INDICATORS OF CELLS LINE L<sub>929</sub> *IN VITRO***

Combined effect of neutron, gamma and light (red band) irradiation to morphological changes in the cell culture was investigated. It was found that in the presence of photosensitizing agents with neutron capture properties with molecular structure and also magnetically driven nano-complexes of both combined neutrons and red light causes around 93 % cell death of proliferating cells *in vitro*.

**Keywords:** culture proliferating cells, thermal neutrons, the red light range, survival, apoptosis.

REFERENCES

1. Kuplennikov E.L., Dovbnya A.N., Telegin Yu.N. et al. Neutron beam therapy: review. - Kharkov: KIPT, 2011. - 31 p. (Rus)
2. Navruzov S.N. Kakhkhorov Zh.N., Khodzhaeva N.Kh. // Archives of clinical and experimental medicine. - 2014. - Vol. 23, No. 1. - P. 20 - 22. (Rus)
3. Borisov G.I. // Fizika elementarnykh chastits i atomnogo yadra. - 2011. - No. 5. - P. 1371 - 1479. (Rus)
4. Salt C., Lennox A.J., Takagaki M. et al. Boron and gadolinium neutron capture therapy // Russian Chemical Bulletin. - 2004. - Vol. 53, Iss. 9. - P. 1871 - 1888.
5. Baranov A.P., Koryakin S.N., Ul'yanenko S.E. et al. // Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal. - 2007. - Vol. 6, No. 1. - P. 80. (Rus)
6. Gamaleya N.F., Kutsenok V.V. // Doctor. - 2003. - Vol. 4. - P. 28 - 31. (Rus)
7. Moskvina S.V., Buylin V.A. Basics of laser therapy. - Tver: Triada, 2006. - 256 p.
8. Tsyb A.F., Kaplan M.A. // Rossiyskie meditsinskie vesti. - 2002. - No. 3. - P. 19 - 24. (Rus)
9. Olyushin V.E., Komfort A.V., Ulitin A.Yu. // Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal. - 2007. - Vol. 6, No. 1. - P. 23. (Rus)
10. Nikitina R.G., Mardynskaya V.P., Morozova T.G. et al. // Byulleten' eksperimental'noj biologii i meditsiny. - 2009. - Vol. 148, No. 8. - P. 209 - 212. (Rus)
11. Evstigneeva R.P., Zaitsev A.V., Luzgina V.N. et al. Carboranylporphyrins for boron neutron capture therapy of cancer // Current Medicinal Chemistry - Anticancer Agents. - 2003. - No. 3. - P. 383 - 392.
12. Ol'shevskaya V.A., Zaitsev A.V., Luzgina V.N. et al. Novel boron containing derivatives of 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin: synthesis and toxicity for drug-resistant tumor cells // Bioorganic and Medicinal Chemistry. - 2006. - Vol. 14, No. 1. - P. 109 - 120.
13. Lisovskij M.V., Zhdanov A.P., Zhizhin K.Yu., Kuznetsov N.T. // Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal. - 2007. - Vol. 6, No. 1. - P. 48. (Rus)
14. Kaplan M.A., Nikitina R.G., Ol'shevskaya V.A. et al. // Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal. - 2007. - Vol. 6, No. 1. - P. 16. (Rus)
15. Kul'velis Yu.V., Trunov V.A., Lebedev V.T. et al. // Poverkhnost'. Rentgenovskie, sinkhrotronnye i nejtronnye issledovaniya. - 2009. - No. 5. - P. 55 - 62. (Rus)
16. Ol'shevskaya V.A., Zaitsev A.V., Kononova E.G. et al. // Doklady akademii nauk. - 2007. - Vol. 414, No. 2. - P. 199 - 203. (Rus)
17. Kul'velis, Yu.V., Trunov V.A., Lebedev V.T. et al. // Fizika tverdogo tela. - 2010. - Vol. 52, Iss. 5. - P. 974 - 978. (Rus)
18. Knyazev A.V., Bulanov E.N., Alejnik D.Ya. et al. // Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N. I. Lobachevskogo. - 2012. - No. 5 (1). - P. 88 - 94. (Rus)
19. Kulakov V.N., Shimanovskij N.L., Panov V.O. et al. // Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal. - 2010. - Vol. 9, No. 3. - P. 15 - 16. (Rus)
20. Klassen N.V., Kedrov V.V., Kobelev N.P. et al. // Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal. - 2007. - Vol. 6, No. 1. - P. 75. (Rus)
21. L-929 (NCTC-clone 929, Clone of strain L) (Connective tissue, mouse) (21 December 2009). - URL: <http://www.viomed.com/services/product/1929.htm>
22. Research of apoptosis in radiation immunology: guidance / SI "Scientific Center for Radiation Medicine, Academy of Medical Sciences of Ukraine". - Kyiv, 2010. - 27 p. (Ukr)
23. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. Statistical methods in biomedical research using Excel. - 2nd ed. - Kyiv: MORION, 2001. - 408 p. (Rus)
24. Lavrenchuk H.Yo. Survival and proliferative activity of L-cells exposure to neutrons of different energy // J. Toxicol. Abstr. - 1987. - Vol. 10, No. 2. - P. 5 - 6.

Надійшла 18.03.2016

Received 18.03.2016