

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ БІНАРНИХ ПРОМЕНЕВИХ ТЕХНОЛОГІЙ НА ЗЛОЯКІСНІ КЛІТИНИ ЛЮДИНИ *in vitro*

Г. Й. Лавренчук, В. В. Талько, А. В. Чернишов

ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини, гематології та онкології Національної академії медичних наук України”, Київ, Україна

Медичні терапевтичні джерела іонізуючого випромінювання, головним чином, дистанційні джерела γ -випромінювання та прискорювачі електронів досягли практично межі свого технічного розвитку і дозволяють націлювати іонізуюче випромінювання (ІВ) на пухлину з дуже високим ступенем вибіркості та конформності. Однак при цьому ефективність лікування злоякісних пухлин багатьох видів досі не відповідає необхідним вимогам. Надмірно високе променеве навантаження на нормальні тканини організму все ще є основним обмеженням при спробах збільшення терапевтичної ефективності променевої терапії (ПТ) за рахунок ескалації дози опромінення пухлини. Це є серйозним обмеженням застосування радикальної дистанційної ПТ у клінічній практиці. Одним із шляхів підвищення терапевтичної ефективності ПТ є розробка та впровадження в клінічну практику фотон-захватної терапії (ФЗТ), що є поруч із нейтрон-захватною терапією (НЗТ), різновидом бінарної променевої терапії (БПТ). БПТ – це технологія лікування злоякісних новоутворень за допомогою ІВ, в якій для забезпечення протипухлинного ефекту використовуються два компоненти – препарат, що вводиться в організм, і зовнішнє джерело ІВ [1]. Препарат, що знаходиться в пухлині, збільшує її поглинаючу здатність щодо зовнішнього опромінення, тим самим підвищуючи величину поглиненої дози. На відміну від променевої терапії з використанням препаратів-радіомодифікаторів, здатних змінювати радіочутливість пухлинних тканин, у БПТ використовуються препарати, що не мають вираженої біологічної активності у дозах, що застосовуються. Такі препарати повинні мати у своєму складі один або кілька хімічних елементів, здатних взаємодіяти із зовнішнім ІВ зі значно більшою ймовірністю, ніж елементи, що входять до складу нормальних тканин. Актуальність досліджень у галузі БПТ очевидна, а наявні на даний час результати роблять необхідним проведення їх аналізу для подальшого розвитку БПТ як медичної протипухлинної технології.

Мета роботи – дослідити структурні та морфо-функціональні зміни в тест-системах проліферуючих та дормантних злоякісних (лінія А-549) і нормальних (фібробласти) клітинах людини при поєднанні рентгенівського випромінювання з гадолінійвмісним фотон-захватним агентом «Дотавіст» та червоного світла з фотосенсибілізатором «Фотолон».

Вивчення морфофункціональних характеристик (кінетика росту, проліферативна та мітотична активність, наявність атипичних клітин) при інкубації з гадолінійвмісним фотон-захватним агентом «Дотавіст» у широкому діапазоні концентрацій (5, 10, 25, 50, 100 та 200 мкл/мл) дозволило встановити особливості його впливу на злоякісні клітини: при низьких концентраціях 5 ÷ 25 мкл/мл проліферативна та мітотична активності не відрізняються від контролю. Водночас за високих концентрацій 100 та 200 мкл/мл спостерігали деструкцію моношару клітин, структурні зміни в культурі клітин та появу в культурі атипичних клітин. Аналогічні характерні зміни структурних та морфофункціональних характеристик спостерігали і в культурі нормальних фібробластів людини, а саме: деструктивні зміни у культурі наступали при інкубації з «Дотавіст» в концентрації 100 та 200 мкл/мл.

Дослідження у порівняльному аспекті особливостей клітинних реакцій проліферуючих злоякісних клітин людини А-549 та нормальних фібробластів людини 6-го пасажу при інкубації з фотосенсибілізатором «Фотолон» (ФС) показали протилежні ефекти морфофункціональних характеристик культур клітин: цитотоксичний вплив на злоякісні клітини А-549 проявлявся при найменших концентраціях 5 та 10 мкл/мл. При підвищенні концентрації фотосенсибілізатора зменшується щільність клітинної популяції, мітотична активність клітин та наростає кількість атипичних клітин: двоядерних, клітин з мікроядрами та з ознаками апоптозу. Збільшення концентрації ФС 100 та 200 мкл/мл призвело до деструктивних змін клітинного моношару: зменшення розмірів клітин, втрати цитоплазми, зменшення кількості мітозів, збільшення аномальних клітин (двоядерних та клітин з мікроядрами).

В культурі нормальних фібробластів в області концентрацій 5 ÷ 200 мкл/мл не спостерігали статистично значущих відмінностей щільності клітинної популяції. Однак, мітотична активність помірно зменшена, у порівнянні з контролем. Водночас, за концентрації 25 мкл/мл і вище в культурі

фібробластів з'являються атипівні клітини з 2 і більше ядрами, з мікроядрами, з ядерними аномаліями, такими як каріорексис, хвостаті ядра, ядра атипівної форми, гантелеподібні ядра тощо. Це свідчить про генотоксичні властивості фотосенсибілізатора на нормальні фіброласти людини.

Опромінення проліферуючих злоякісних клітин лінії А-549 рентгенівськими променями в дозах 1,0 Гр, 5,0 Гр та 10,0 Гр інактивували злоякісні клітини лінії А-549 на 10 %, 46 % та 80 % відповідно величині дози.

Опромінення клітин лінії А-549 в присутності препарату «Дотавіст» у концентрації 2,97 мг гадотерової кислоти в 1,0 мл поживного середовища має значно більшу біологічну ефективність. Так, опромінення клітин у дозі 1,0 Гр в присутності фотон-захватного агенту на 50 % інгібує проліферацію клітин, пригнічуючи їх мітотичну активність. Опромінення рентгенівськими променями в дозі 10,0 Гр в присутності препарату «Дотавіст» гальмує на 93 % ріст та поділ злоякісних клітин, що свідчить про високу ефективність даної бінарної променевої технології.

Вивчення клітинних реакцій в умовах впливу на проліферуючі злоякісні клітини А-549 світла червоного діапазону у дозі 45 Дж/см² окремо чи у поєднанні з фотосенсибілізатором «Фотолон» в концентрації, що не викликає видимих змін в популяції клітин (0,05 мг/мл), з наступним опроміненням рентгенівськими променями в дозах 1,0 Гр, 0,5 Гр та 10,0 Гр показало, що за поєданого впливу червоного світла з фотосенсибілізатором та рентгенівських променів в дозах від 1,0 Гр до 10,0 Гр відбувається пригнічення проліферації клітин А-549 від 50 % до 90 % відповідно, залежно від дози опромінення, а їх мітотична активність знижується до 4 % відносно ефектів тільки червоного світла.

Вивчення впливу двох бінарних променевих технологій на злоякісні клітини людини лінії А-549, а саме: поєднання червоного світла (45 Дж/см²) з «Фотолоном» (0,05 мг/мл) та рентгенівських променів у дозах 1,0 Гр, 5,0 Гр та 10,0 Гр з препаратом «Дотавіст» у концентрації 10 мкл/мл, що відповідає 2,97 мг гадотерової кислоти на 1,0 мл поживного середовища, дозволили встановити, що загибель злоякісних клітин, опромінених в дозі 1,0 Гр, становила 64 %, 5,0 Гр – 86 % і 10,0 Гр – 99 % відносно контролю. 1 % клітин, що вижили, можуть дати рецидивування первинної пухлини. Це можуть бути клітини, що знаходяться у спокої, а також поліплоїдні клітини, що виникають в пухлині у великій кількості за несприятливих умов росту.

Експериментально показано, що нормальні проліферуючі фіброласти мали майже аналогічну радіочутливість і, відповідно, клітинну реакцію на дію рентгенівського опромінення та «Дотавісту», як і злоякісні проліферуючі клітини лінії А-549. Такі біологічні ефекти треба мати на увазі, розглядаючи роль стовбурових клітин у відновленні як нормальних тканин (репопуляція), так і тканин пухлини (рецидивування).

Встановлено, що опромінення нормальних клітин рентгенівськими променями у дозах 1,0 Гр, 5,0 Гр та 10,0 Гр у поєднанні з фотодинамічним впливом (червоне світло та «Фотолон» в концентрації 0,05 мг/мл) викликають загибель 43 %, 67 % та 88 % клітин, відповідно дозі.

1. Комбінований вплив двох бінарних променевих впливів (фотон-захватної терапії з «Дотавістом» та червоного світла з «Фотолоном») на нормальні фіброласти призвели до істотної загибелі клітин, а саме: опромінення в дозі 1,0 Гр з «Дотавістом», червоним світлом з «Фотолоном» призвело до інактивації 87 % клітин; опромінення в дозі 5,0 Гр з «Дотавістом», червоним світлом з «Фотолоном» призвело до інактивації 94 % клітин, а після опромінення в дозі 10,0 Гр та вищезазначеного комплексу інактивували 100 % клітин. Таким чином, виявилось, що культура нормальних фібробластів більш чутлива до впливу комплексу бінарних променевих дій, ніж культура злоякісних клітин лінії А-549.

Поєднання фотон-захватного (з «Дотавістом») та фотодинамічного (з «Фотолоном») впливів призводять до загибелі 90 % злоякісних клітин у стані спокою (у стаціонарній фазі росту). Тобто, навіть при таких умовах впливу (рентгенівські промені в дозі 10 Гр одночасно з «Дотавістом» в концентрації 100 мкл/мл (29,7 мг гадотерової кислоти) виживає 10 % клітин, які при подальшому культивуванні змінюють свою морфологію, генотип і адгезивність.

Отримані результати за своєю суттю складають підґрунтя доклінічного етапу оцінки ефективності препаратів, що застосовуються у бінарних технологіях, зокрема, «Дотавісту» у випадку фотон-захватного методу бінарної променевої терапії та «Фотолону» для фотодинамічної терапії.

1. Променева терапія ХХІ століття / В. С. Іванкова, О. Ю. Столярова, Л. М. та ін. *Клінічна онкологія*. 2018. Т. 8, № 2(30). Режим доступу: <https://www.clinicaloncology.com.ua/article/magazine/35>