УДК 535.09+57.043
DOI: https://doi.org/10.17721/3041-1491/2024.11-26

Михайло ЗАБОЛОТНИЙ[1], канд. фіз.-мат. наук, ст. наук. співроб.
ORCID ID: 0009-0004-9852-7560
e-mail: fedcba137@ukr.net

Людмила АСЛАМОВА[1], канд. біол. наук, ст. наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0003-1896-9357
e-mail: aslamova258@gmail.com

Максим БАРАБАШ[2], д-р тех. наук, ст. наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0001-5054-5031
e-mail: bashik_77@ukr.net

Галина СОЛЯНИК[3], д-р мед. наук, проф.
ORCID ID: 0000-0002-8657-1263
e-mail: gsolyanik@gmail.com

Віктор ЧЕРНЯК[1], д-р мед. наук, проф.
ORCID ID: 0000-0001-8424-4691
e-mail: victorchernyak.ohta@gmail.com

[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
[2]Технічний центр НАН України, Київ, Україна,
[3]Інститут ЕПОР НАН України імені Р. Є. Кавецького, Київ, Україна

МОДИФІКАЦІЯ ОПТИЧНИХ СПЕКТРІВ ТА ЦИТОСТАТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ДОКСОРУБІЦИНУ ІОНІЗУЮЧИМ ОПРОМІНЮВАННЯМ

В с т у п . ***Досліджуються закономірності впливу попереднього опромінення електронами фізіологічного розчину на оптичні і цитотоксичні властивості фізіологічного розчину та розчиненого в ньому доксорубіцину з метою підвищення їхньої цитостатичної ефективності.***

М е т о д и . ***Енергія електронів опромінення дорівнювала 1 МеВ, поглинена доза була в межах (2…80) кГр. Було зареєстровано, що величина поглиненої дози опромінення впливає на оптичні характеристики фізіологічного розчину в УФ, видимому і в ІЧ-діапазоні. Зміни у спектрах екстинкції фізіологічного розчину залежали як від поглиненої дози, так і від довжини світлової хвилі.***

Р е з у л ь т а т и . ***Встановлено, що радіаційно обумовлені зміни властивостей екстинкції та цитостатичної активності опроміненого фізіологічного розчину тривають 2–4 місяці залежно від величини поглиненої дози. Показано, що інтенсивність флуоресценції фізіологічного розчину, викликаної збудженням на довжині хвилі 260 нм, досягає найбільшого значення за величини поглиненої дози опромінення (10…40) кГр. Доведено, що положення смуг спектрів флуоресценції залежить від величини поглиненої дози. Встановлено, що, незважаючи на перебудову центра флуоресценції, обумовлену радіаційними опроміненням, кількість смуг спектрів залишається сталою.***

В и с н о в к и . ***Було показано, що попереднє опромінення ФР перед розчиненням у ньому доксорубіцину приводить до посилення його цитостатичної активності. Цей***

© Заболотний Михайло, Асламова Людмила,
Барабаш Максим, Соляник Галина, Черняк Віктор, 2024

ефект найбільш виражений за відносно низьких концентрацій доксорубіцину в розчині. Мінімальна доза поглиненого фізіологічним розчином радіаційного опромінення, за якої фіксуються зміни спектрів розчину доксорубіцину, дорівнює 4 кГр.

Ключові слова: ***доксорубіцин, цитотоксичність, фізіологічний розчин, високоенергетичні електрони, оптичні спектри, карцинома.***

Вступ

Досвід застосування протипухлинної хіміотерапії показав обмеженість її можливостей і низьку ефективність при лікуванні місцево-поширених і дисемінованих форм злоякісних новоутворень. У зв'язку з цим визначення нових біологічно активних матеріалів, дослідження їхніх фізико-хімічних та терапевтичних властивостей, взаємозв'язку між ними та створення на їх основі ефективних і малотоксичних протипухлинних препаратів є одним із найбільш актуальних завдань сучасної фізичної медицини та практичної онкології (Mitola, Falvo, & Bertolini, 2021, pp. 1131–1145). Опубліковані дані (Aslamova et al., 2023, pp. 149–152) показали перспективність неруйнівного способу модифікації як фізичних, так і терапевтичних властивостей, деяких протипухлинних препаратів без зміни їхнього хімічного складу.

Метою роботи є дослідження взаємозв'язку між оптичними спектрами та цитостатичною активністю доксорубіцину, розчиненого в ФР, який був попередньо опромінений високоенергетичними електронами, що може забезпечити зменшення дозового навантаження доксорубіцином в онкології й обумовити мінімізацію побічних негативних ефектів при його застосуванні.

Методи

У процесі досліджень використовувався ФР у герметичних скляних ампулах 5 мл. Розчини препаратів доксорубіцин виготовляли з порошку доксорубіцину (Sigma, США) та фізіологічного розчину (ФР), доводячи концентрацію активного препарату до 5 мг/мл. Опромінення водного розчину хлориду натрію ФР проводили електронами з енергією 1 МеВ на резонансному лінійному прискорювачі електронів "Аргус" (тривалість імпульсів – 3,3 мкс; частота імпульсів – 400 Гц) у лабораторії радіаційних технологій Інституту фізики НАН України. Величина поглиненої дози (I) була в межах (2 … 80) кГр.

Спектри поглинання розчину доксорубіцину у ФР реєстрували за допомогою ІЧ-спектрометра Фур'є (Bruker IFS 66, Німеччина) та спектрофотометра з приставкою дифузного відбиття UV-260 Shimadzu. Флуоресценцію зразків вимірювали за допомогою спектрофлуориметра CaryEclipse (Varian). Для дослідження цитостатичної активності використовували клітини карциноми легені Льюїс (LLC).

Біомедична частина досліджень проводилась згідно зі стандартизованою методикою (Заболотний та ін., 2022, с. 131–139). Були проведені спеціальні дослідження щодо визначення впливу попереднього опромінення ФР на протипухлинні властивості розчиненого в ньому доксорубіцину. Експерименти проводились *in vitro* за використання лінії злоякісних клітин карциноми легені

Льюїса (LLC). Як показник фармакологічної активності використовували цитотоксичну / цитостатичну дію водних розчинів протипухлинних препаратів (з опроміненням та без нього) щодо клітин LLC у дослідах *in vitro*. Для цього пухлинні клітини висаджували в лунки 96-лункової планшети в 0,1 мл поживного середовища (2×10^5 кліт./мл) та інкубували протягом ночі. Після того до клітин додавали препарати в 0,1 мл свіжого середовища у широкому діапазоні концентрацій, які прогресивно зменшувалися. У контрольні лунки додавали свіже середовище в такому ж об'ємі без тест-агента. Кількість живих клітин у лунках через добу інкубації визначали за допомогою МТТ-тесту (Заболотний та ін., 2024, с. 1001–1008).

Результати

Вплив опромінення на властивості ФР ілюструє рис. 1, де наведені спектральні залежності екстинкції (Е) ФР у видимому та УФ-діапазоні від величини поглиненої дози.

У діапазоні поглинання валентних коливань молекулярних груп OH-NH-CH (3800–2400 $см^{-1}$) бачимо (рис. 2) істотне зростання інтенсивності цієї смуги в усіх без винятку зразках з опроміненим ФР. Спостерігається високочастотний зсув максимуму цієї смуги відносно смуги поглинання доксоробіцину в неопроміненому ФР.

Окремо були проведені дослідження ІЧ-спектрів поглинання за невеликих значень дози поглиненого ФР опромінення. Було проведено порівняння спектрів поглинання доксорубіцину в неопроміненому та опроміненому розчиннику за $I = 2$ та 4 кГр. Одержані дані досліджень в ІЧ-діапазоні спектра показали, що мінімальною дозою поглиненого розчинником високоенергетичного електронного опромінення, за якої реєструються зміни спектра поглинання, є 4 кГр.

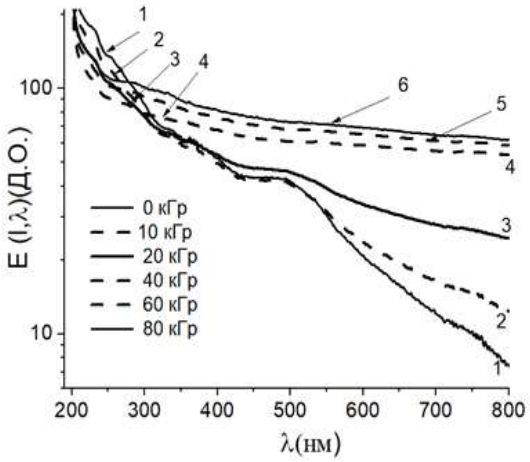


Рис. 1. УФ та видимі спектри поглинання ФР у логарифмічному масштабі за різних значень поглиненої дози електронного опромінення.
(Крива 1 одержана без опромінення, 2 – під час поглиненої дози 10 кГр, 3 – 20 кГр, 4 – 40 кГр, 5 – 60 кГр, 6 – 80 кГр)

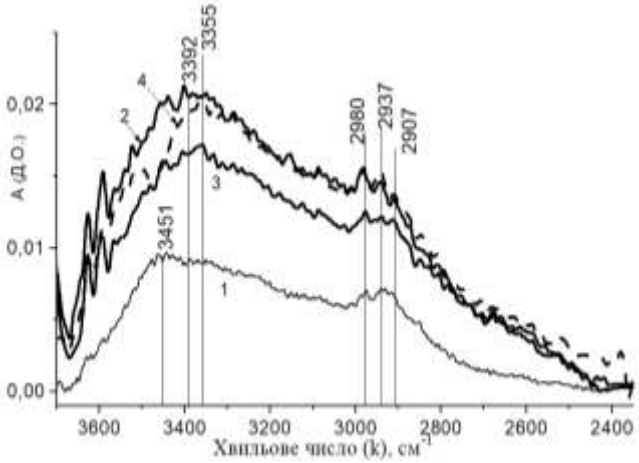


Рис. 2. FTIR-спектри поглинання доксорубіцину, розчиненого ФР за різних *I*.
(Крива 1 характеризує поглинання за *I* = 0 кГр, крива 2 одержана за *I* = 10 кГр, крива 3 – 40 кГр, крива 4 – 80 кГр)

Для одержання додаткової інформації про властивості силових центрів ФР, що визначають характеристики оптично індукованих переходів, була досліджена флуоресценція ФР і вплив на неї опромінення електронами ФР. Під час дослідження флуоресценції використовувалась доза електронного опромінення, яка дорівнювала 10, 40 та 80 кГр. Довжина хвилі збуджувального лазера дорівнювала λ = 260 нм. Спектри флуоресценції представлено на рис. 3 та 4.

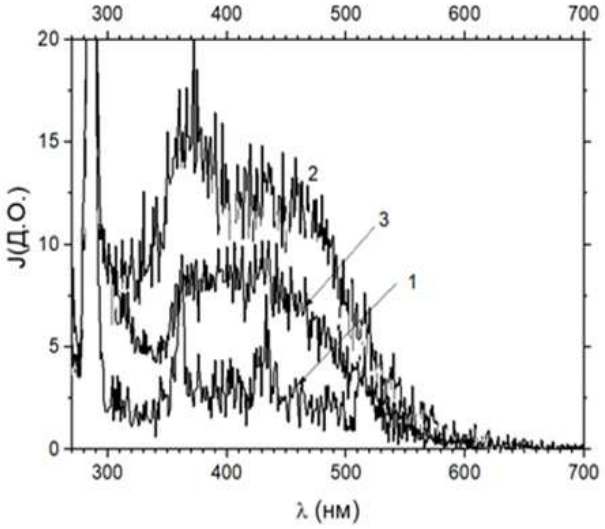


Рис. 3. Оригінальні спектри інтенсивності (*J*) флуоресценції ФР не опроміненого зразка (1), зразка з *I* = 10 кГр (2) та *I* = 80 кГр (3)

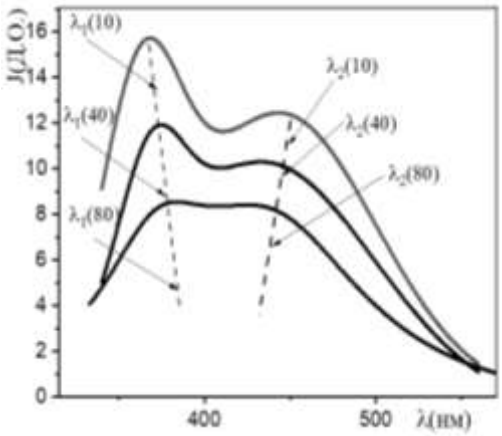


Рис. 4. Спектри інтенсивності (криві 2 і 3 представлені на рис. 3) після шумопригнічення

Особливістю одержаних спектрів є найбільша інтенсивність флуоресценції, що реєструється у зразка з найменшим значенням *I* опромінених зразків. Було використано розподіли Лоренца під час аналізу спектрів флуоресценції (рис. 3), одержаних після опромінення (сигнал флуоресценції не опроміненого зразка не реєструється на фоні шуму). Зважаючи на це припущення і після позбавлення шуму, спектри флуоресценції будуть мати структуру, наведену на рис. 4. Графіки рис. 4 свідчать, що всі спектри флуоресценції можна представити у вигляді двох симетричних розподілів Лоренца, центри яких $\lambda_1(I) > \lambda_2(I)$ залежать від *I*. Результати досліджень впливу опромінення ФР на цитотоксичну / цитостатичну дію доксорубіцину ілюструють залежності на рис. 5.

На рис. 5 показано, що інкубація клітин LLC протягом 24 год за наявності доксорубіцину, розчиненого в неопроміненому ФР, призводить до залежного від концентрації зменшення кількості живих клітин (крива 1). Водночас доксорубіцин, розчинений в опроміненому ФР, призводить до посилення цитотоксичної / цитостатичної дії, яка найбільше проявляється за низьких концентрацій (крива 2): зокрема, кількість живих клітин LLC за концентрацій, менших від 3 мкМ, зменшилася в середньому на 20 % порівняно з дією доксорубіцину, розчиненого в неопроміненому ФР.

Рис. 6 ілюструє результати проведених біологічних досліджень, які показали, що опромінення високоенергетичними електронами ФР без додавання доксорубіцину обумовлює виражену цитотоксичну / цитостатичну його дію, ефективність якої залежить від терміну після опромінення. Як видно на діаграмі рис. 6, виживаність пухлинних клітин LLC у середовищі з додаванням ФР, опромінення якого проводилось за 1 місяць до проведення культуральних досліджень, знижувалась на 83 %, а через 4 місяці – 22 %.

Таким чином, отримані результати підтверджують здатність високоенергетичного електронного опромінення розчинника підвищувати фармакологічну активність протипухлинних препаратів у діапазоні низьких концентрацій.

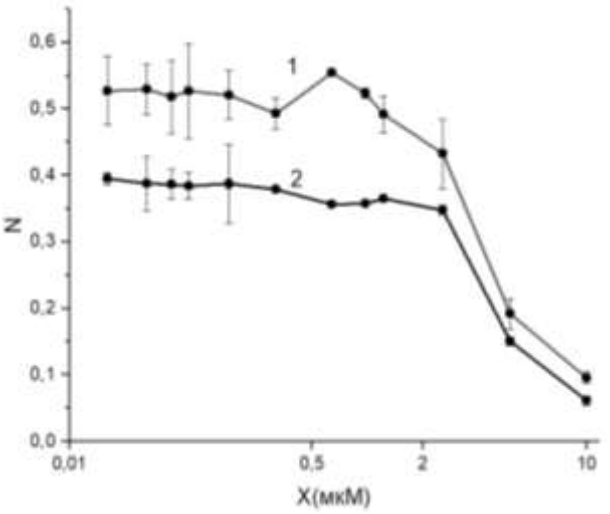


Рис. 5. Кількість (*N*) живих клітин LLC (у % від відповідного показника в контрольних лунках) після 24-годинної інкубації з доксорубіцином (за різних концентрацій *X*), розчиненим у неопроміненому (1) та опроміненому 40 кГр (2) ФР

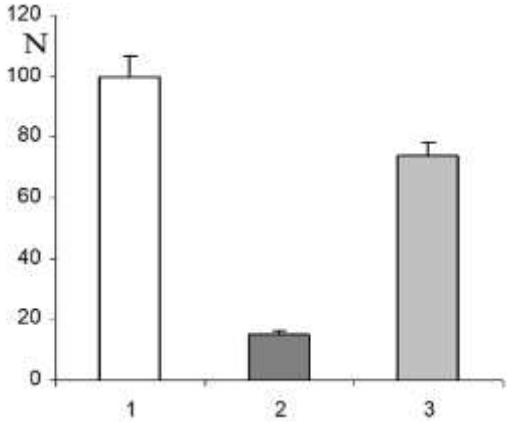


Рис. 6. Вплив опромінення ФР на виживаність клітин карциноми легені Льюїс (1 – ФР без опромінення, 2 – через 1 місяць після опромінення (*I* = 40 кГр), 3 – через 4 місяці (*I* = 40 кГр)

Додаткова інформація була одержана в результаті проведеного ТОВ "Юрія-Фарм" дослідження "Порівняльне дослідження гострої токсичності препаратів хлориду натрію при одноразовому парентеральному введені мишам" (рік виконання 2023, Номер дослідження: № 01082023). У результаті проведених досліджень було зроблено 8 висновків. Останній із них стверджує, що "Результати проведеного дослідження не надають переконливих даних, які б свідчили про відмінності профілів токсичності досліджуваних препаратів.

Зважаючи на високий рівень структурної подібності досліджуваних речовин, з метою виявлення відмінностей їх впливу рекомендовано застосування більш чутливих методів дослідження. Зокрема, дослідження цитотоксичності на культурах клітин різного органного походження".

Дискусія і висновки

1. Досліджено ефект модифікації цитостатичної активності доксорубіцину під час використання попереднього опромінення ФР електронами з енергією 1 МеВ і дозою поглиненого опромінення в межах 10–80 кГр та запропоновано пояснення ефекту за допомогою моделі бабстонів з оцінюванням впливу сусідів на розподіл електричного поля бабстону.

2. Використання попередньо опроміненого ФР доксорубіцину змінює його спектр екстинкції. Мінімальна доза поглиненого розчинником високоенергетичного електронного опромінення (1 МеВ), за якої фіксуються зміни ІЧ-спектрів розчинених в них препаратів, дорівнює 4 кГр.

3. Спектри флуоресценції ФР при збудженні його світлом $\lambda = 260$ нм можна представити у вигляді двох симетричних розподілів Лоренца, центри яких $\lambda_1(I) > \lambda_2(I)$ залежать від I.

4. Вплив високоенергетичного електронного опромінення ФР на ІЧ-спектри та цитостатичну активність доксорубіцину зберігається упродовж 2–4 місяців.

5. Цитостатична активність доксорубіцину, розчиненого в опроміненому ФР, перевищує цитотоксичну / цитостатичну дію щодо клітин LLC доксорубіцину, розчиненого в неопроміненому ФР. Кількість живих клітин LLC під впливом опроміненого ФР доксорубіцину за концентрацій, менших від 3 мкМ, зменшилася до 20 % (залежно від I) порівняно з відповідним показником за не опроміненому ФР.

6. Доведено, що екстремуми спектра поглинання ФР у видимому та ближньому УФ-ділянках спектрів не змінюють свого положення при опроміненні високоенергетичними (1 МеВ) електронами за поглиненої дози $4 \text{ кГр} \le I \le 80$ кГр.

Визначення природи центрів поглинання світла та флуоресценції ФР, які утворюються під дією високоенергетичного електронного опромінення, потребує додаткових досліджень. Також потрібно продовжити дослідження, започатковані науковою роботою ТОВ "Юрія-Фарм" "Порівняльне дослідження гострої токсичності препаратів хлориду натрію при одноразовому парентеральному введенні мишам" (рік виконання 2023, Номер дослідження: №01082023). У результаті проведеного дослідження було зроблено 8 висновків, останній з яких стверджує, що "Результати проведеного дослідження не надають переконливих даних, які б свідчили про відмінності профілів токсичності досліджуваних препаратів. Зважаючи на високий рівень структурної подібності досліджуваних речовин, з метою виявлення відмінностей їх впливу рекомендовано застосування більш чутливих методів дослідження. Зокрема, це стосується дослідження цитотоксичності на культурах клітин різного органного походження". Проведення цих досліджень

буде стимулювати нові методи збільшення цитостатичних активностей протипухлинних препаратів без використання нанодомішок.

Внесок авторів: Михайло Заболотний – концептуалізація, написання; Людмила Асламова – методологія, валідація даних; Максим Барабаш – валідація даних; Галина Соляник – методологія, валідація даних; Віктор Черняк – концептуалізація.

Подяки, джерела фінансування. Автори роботи висловлюють свою щиру подяку співробітникам ТОВ "ЮРІЯ-ФАРМ" та особливо доктору медичних наук, професору, президенту ТОВ "ЮРІЯ-ФАРМ" Миколі Івановичу Гуменюку за підтримку та надання можливості проведення наукових досліджень нових методів збільшення цитостатичних активностей протипухлинних препаратів без використання нанодомішок.

Список використаних джерел

Заболотний, М.А., Асламова, Л.І., Довбешко, Г.І., Гнатюк, О.П., Неймаш, В.Б., Поварчук, В.Ю., Орел, В.Е., Колесник, Д.Л., Кіркілевська, Л.М., & Соляник, Г.І. (2022). Вплив опромінення фізіологічного розчину високоенергетичними електронами на фізико-хімічні властивості та цитостатичну активність доксорубіцину. *Ядерна фізика та енергетика*, 23(2), 131–139. https://doi.org/10.15407/jnpae2022.02.131

Заболотний, М.А., Асламова, Л.І., Довбешко, Г.І., Гнатюк, О.П., Соляник, Г.І., Данкевич, В.П., Леонов, Д.С., Барабаш, М.Ю., & Черняк, В.А. (2024). Вплив високоенергетичного електронного опромінення фізіологічного розчину на його оптичні характеристики та цитотоксичну/цитодинамічну активність. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*, 22(2), 1001–1008. https://doi.org/10.15407/nnn.22.02.481

Aslamova, L., Zabolotnyy, M., Dovbeshko, G., Solyanik, G., Gnatyuk, O., & Tsapko, M. (2023). Irradiation of physiological solution with high energyelectrons – a way of increase cytotoxic/cytostatic effect. In Urbonavičius B.G. et al. (Eds.), *Medical Physics in the Baltic States 2023* (pp. 149–152). Kaunas University of Technology. http://medphys.lt/medphys2023/images/MedPhys23/Proceedings%20of%20the%20conference.pdf

Mitola, G., Falvo, P., & Bertolini, F. (2021). New Insight to Overcome Tumor Resistance: An Overview from Cellular to Clinical Therapies. *Life*, 11(11), 1131. https://doi.org/10.3390/life11111131

References

Aslamova, L., Zabolotnyy, M., Dovbeshko, G., Solyanik, G., Gnatyuk, O., & Tsapko, M. (2023). Irradiation of physiological solution with high energyelectrons – a way of increase cytotoxic/cytostatic effect. In Urbonavičius B.G. et al. (Eds.), *Medical Physics in the Baltic States 2023* (pp. 149–152). Kaunas University of Technology. http://medphys.lt/medphys2023/images/MedPhys23/Proceedings%20of%20the%20conference.pdf

Mitola, G., Falvo, P., & Bertolini, F. (2021). New Insight to Overcome Tumor Resistance: An Overview from Cellular to Clinical Therapies. *Life*, 11(11), 1131. https://doi.org/10.3390/life11111131

Zabolotny, M.A., Aslamova, L.I., Dovbeshko, G.I., Hnatyuk, O.P., Neimash, V.B., Povarchuk, V.Yu., Orel, V.E., Kolesnyk, D.L., Kirkilevska, L.M., & Solyanyk, G.I. (2022). The effect of irradiation of physiological solution with high-energy electrons on the physicochemical properties and cytostatic activity of doxorubicin. *Nuclear Physics and Atomic Energy*, 23(2), 131–139 [in Ukrainian]. https://doi.org/10.15407/jnpae2022.02.131

Zabolotnyy, M.A., Aslamova, L.I., Dovbeshko, G.I., Hnatiuk, O.P., Solyanyk, G.I., Dankevich, V.P., Leonov, D.S., Barabash, M.Yu., & Chernyak, V.A. (2024). Effect of high-energy electron irradiation of saline solution on its optical characteristics and cytotoxicity/cytodynamic activity. *Nanosystems, Nanomaterials, Nanotechnologies*, 22(2), 1001–1008 [in Ukrainian]. https://doi.org/10.15407/nnn.22.02.481

Отримано редакцією збірника / Received: 18.06.24
Прорецензовано / Revised: 08.07.24
Схвалено до друку / Accepted: 30.09.24

Mykhaylo ZABOLOTNYY[1], PhD (Phys. & Math.), Senior Researcher
ORCID ID: 0009-0004-9852-7560
e-mail: fedcba137@ukr.net

Lyudmila ASLAMOVA[1], PhD (Biol.), Senior Researcher
ORCID ID: 0000-0003-1896-9357
e-mail: aslamova258@gmail.com

Maxim BARABASH[2], DSc (Engin.), Senior Researcher
ORCID ID: 0000-0001-5054-5031
e-mail: bashik_77@ukr.net

Galyna SOLYANIK[3], DSc (Med.), Prof.
ORCID ID: 0000-0002-8657-1263
e-mail: gsolyanik@gmail.com

Viktor CHERNYAK[1], DSc (Med.), Prof.
ORCID ID: 0000-0001-8424-4691
e-mail: victorchernyak.ohta@gmail.com

[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
[2]Technical Center of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[3]R. E. Kavetskyi Institute of EPO of NASU, Kyiv, Ukraine

MODIFICATION OF OPTICAL SPECTRA AND CYTOSTATIC ACTIVITY OF DOXORUBICIN BY IONIZING RADIATION

Introduction. ***The regularities of the effect of prior electron irradiation of saline solution on the optical and cytotoxic properties of saline solution and doxorubicin dissolved in it are studied in order to increase their cytostatic efficiency.***

Methods. ***The energy of the irradiation electrons was equal to 1 MeV, the absorbed dose was within (2...80) kGy. It has been reported that the amount of absorbed radiation dose affects the optical characteristics of saline in the UV, visible, and IR regions. Changes in the extinction spectra of the physiological solution depended on both the absorbed dose and the wavelength of the light.***

Results. ***It was established that radiation-induced changes in the extinction properties and cytostatic activity of the irradiated physiological solution last 2-4 months, depending on the amount of the absorbed dose. It is shown that the fluorescence intensity of physiological solution caused by excitation at a wavelength of 260 nm reaches the highest value at the value of the absorbed radiation dose (10...40) kGy. It is shown that the position of the bands of the fluorescence spectra depends on the amount of the absorbed dose. It was established that despite the rearrangement of the fluorescence center, the number of spectral bands due to radiation exposure remains constant.***

Conclusions. ***It was shown that pre-irradiation of the FR before dissolving doxorubicin in it leads to an increase in its cytostatic activity. This effect is most pronounced at relatively low concentrations of doxorubicin in the solution. The minimum dose of radiation absorbed by the physiological solution, at which changes in the spectra of the doxorubicin solution are recorded, is 4 kGy.***

Keywords: ***doxorubicin, cytotoxicity, saline, high-energy electrons, optical spectra, carcinoma.***

Автори М. Барабаш, Г. Соляник та В. Черняк заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Член редакційної колегії М. Заболотний, головний редактор та член організаційного комітету Л. Асламова заявляють про відсутність конфлікту інтересів та невтручання в процес оцінювання цієї статті відповідно до міжнародних стандартів публікаційної етики. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors M. Barabash, G. Solyanik and V. Chernyak declare no conflicts of interest. The member of the Editorial board M. Zabolotnyy, Editor-in-Chief and a member of the Organizing committee L. Aslamova declare the absence of a conflict of interest and has not interfered in the evaluation process of this article, in accordance with international publication ethics standards. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.