

РАДІОЗАХИСНІ ВЛАСТИВОСТІ 2-МЕРКАПТОБЕНЗОТІАЗОЛУ НА КЛІТИНИ *IN VITRO*

©Х. М. Литвинчук¹, Г. Й. Лавренчук¹, В. Р. Гурандо², І. М. Кліщ³, А. О. Ковальчук³

ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»¹

Ужгородський національний університет²

ВДНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»³

РЕЗЮМЕ. Метою роботи було дослідження радіопротекторних властивостей 2-меркаптобензотіазолу у тест-системах первинної та перещеплюваної культур проліферуючих клітин.

Матеріал і методи. Використовували цитологічні і статистичні методи.

Результати. При інкубації перещеплюваних клітин лінії L₉₂₉ з 2-меркаптобензотіазолом у діапазоні концентрацій 0,03–3,00 мкг/м не було виявлено статистично достовірної зміни ($p \leq 0,05$) щільності клітинної популяції у моношарових культурах. Водночас спостерігали для усіх застосованих концентрацій реагенту стимуляцію мітотичної активності на термінальній (5 доба) стадії культивування. Опромінення клітин гамма-квантами ⁶⁰Co в дозах 1, 5 та 10 Гр призвело до дозозалежних морфофункціональних змін у культурі клітин. Опромінення клітин у присутності 2-меркаптобензотіазолу істотно зменшило негативний вплив радіації на показники життєздатності клітин та їх диференціацію в культурі.

Висновки. Кількісна оцінка радіопротекторних властивостей 2-меркаптобензотіазолу у тест-системах культури міогенних клітин та лінії L₉₂₉ (фібробластоподібні клітини) показала, що найвищі показники коефіцієнта захисту (0,31–0,36) реагент показав при концентрації 3 мкг/мл при опроміненні в дозі 1 Гр, а фактор зменшення дози був максимальний – 4, за концентрації 3,00 мкг/мл. За сукупністю даних літератури та результатів власних досліджень можна вважати 2-меркаптобензотіазол реагентом із радіопротекторними властивостями для клітин *in vitro*.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: іонізуюче випромінювання; радіопротектори; культура клітин; проліферація; мітоз; диференціація міогенних клітин; апоптоз.

Вступ. Проблема захисту організму від іонізуючого випромінювання (ІВ) виникла після першого застосування атомної зброї в 40-х роках минулого століття, проте й нині залишається актуальною. На сьогодні, незважаючи на міжнародні угоди, неухильно зростає загроза ядерного тероризму й можливе застосування ядерної зброї у сучасних локальних конфліктах. Як і раніше, високим є ризик позапланового опромінювання значних контингентів людей у випадках радіаційних аварій на атомних електростанціях та підприємствах ядерно-енергетичного комплексу.

Проблема радіопротекції у сучасному світі залишається дуже актуальною, як з точки зору екстреного захисту організму від гострого радіаційного ураження у разі аварійних ситуацій або застосування ядерної зброї, так і внаслідок зростання потреби у застосуванні радіопротекторних агентів у радіаційній медицині та онкології [1–4].

На сьогоднішній день отримано тисячі радіозахисних препаратів [4–6] і тривають розробки нових, які отримують шляхом удосконалення структури старих препаратів, а також іде пошук нових речовин, які мають радіозахисну дію [7–13].

Результатом дії «класичних» радіопротекторів, зокрема амініотіолів, є стан підвищеної радіостійкості у клітині, який супроводжується збільшенням вмісту в ній кількості SH-груп [14, 15]. Високу їх ефективність обумовлює здатність тіолових радіопротекторів дуже швидко (за декілька хвилин) здійснювати захист організму при опромінюванні

у летальних дозах (10–15 Гр), що не притаманно препаратам інших груп. Важливою характеристикою є тропність розподілу та переважне накопичення в радіочутливих тканинах за максимально коротким часом. Тривалість протекторного ефекту залежить від концентрації амініотіолів безпосередньо у цитозолі й субклітинних структурах (ядро, мітохондрії), де вони утворюють лабільні дисульфідні зв'язки з білками, зокрема з цитохромом С і нуклеопротейдами, а також тіоефірні і діамінові зв'язки з ДНК і РНК [5]. Важливим молекулярним механізмом активності амініотіолів є посилення зв'язку ядерного фактора каппа-Б (NFκB), протеїну-1γ (MIP-1γ) та онкосупресора p53 з молекулою ДНК, що викликає активацію деяких генів, зокрема, MnСОД та ін. Крім того, амініотіоли здатні блокувати топоізомеразу II, а також при активації p53 через інгібітор циклінзалежних кіназ p21waf-1 затримувати проходження клітин за цим циклом у фазі G1 та поліпшувати умови для репарації ДНК [14, 15]. Проте переваги на клітинному рівні мають обмеження через високу токсичність та короткочасність дії (до 1–3 год) даної групи радіопротекторів, а також зниження їх активності в умовах фракціонованого опромінювання.

Ефективність дії радіозахисних речовин оцінюють за багатьма показниками. Варто зазначити, що жорсткі вимоги до радіопротекторів стосуються іонізуючого випромінювання у високих дозах, гострого опромінювання і 30-добового періоду спостереження для організмів.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, ювілеї

Мета дослідження – вивчення радіопротекторних властивостей 2-меркаптобензотіазолу за впливом на проліферацію та диференціацію клітин у культурі.

Матеріал і методи дослідження. Морфофункціональні зміни в клітинах досліджували за використанням тест-системи культури клітин лінії L₉₂₉ (інша назва – NCTC-clone 929, Clone of strain L). Первинний штам був отриманий з нормальної підшкірної ареоллярної та жирової тканини 100-денної миші СЗН/Ап чоловічої статі. Клітини L₉₂₉ були обрані для дослідження через здатність до перманентного поділу, з метою створення моделі проліферативної тканини *in vitro*. Культивування здійснювали в повному поживному середовищі RPMI-1640, що містило 4 ммоль/л L-глутаміну, 10 % ембріональної сироватки теляти та 40 мкг/мл гентаміцину. Клітини вирощували при постійній температурі 37 °С на покривних скельцях розміром (16×8) мм, які знаходилися на дні скляних пляшечок, до конфлуентного стану моношару.

Опромінення клітин проводили на апараті «Тератрон» (Канада) (джерело – ⁶⁰Co 1,2 Мев, потужність експозиційної дози 4,3 10⁻⁴ Кл/(кг·с), відстань до об'єкта 80 см) в дозах 1,0; 5,0 та 10,0 Гр через 24 години після посадки.

2-меркаптобензотіазол (2-МБТ) додавали за 1 год перед опроміненням в концентраціях 3,0; 0,3 та 0,03 мкг/мл та культивували впродовж 1–5 діб. Контролем слугували культури клітин без реагента.

Клітинні відповіді оцінювали у різні терміни культивування клітин за загальноприйнятими морфофункціональними показниками життєздатності: проліферативна і мітотична активність та кількість атипичних багатоядерних клітин. Для цього під оптичним мікроскопом «Axioscop» (West Germany) при збільшенні у 400 і 1000 разів у межах сітки методом випадкових полів за С. Б. Стефановим підраховували загальну кількість клітин (щільність клітинної популяції), кількість мітозів і кількість гігантських багатоядерних (2 і більше ядер) клітин. Мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів розраховували на 1000 клітин (%).

У тих же культурах клітин, в яких досліджували їх життєздатність, визначали кількість клітин на стадії апоптозу. Аналізували клітини на протоковому цитофлуориметрі FACStarPlus фірми «Becton Dickinson» (США). Апоптоз фіксували за гіподиплоїдним ДНК-піком, який чітко відділявся від нормального (диплоїдного) ДНК-піка. Оцінювали червону флуоресценцію (канал FL – 2) пропідіймодиду с довжиною хвилі λ 595 нм не менш ніж для 10000 клітин.

Аналіз здатності ембріональних клітин до диференціації був проведений на основі дослі-

джень, виконаних на первинній культурі міогенних клітин новонароджених щурів. Біоматеріал, отриманий із м'язових тканин тварин в асептичних умовах, механічно подрібнювали, потім надавали дезагрегації 0,25 % розчином трипсину. Суспензію клітин двічі відмивали від розчину трипсину шляхом центрифугування 10 хв при 1000 об/хв. Супернатант зливали, а осад диспергували у поживному середовищі такого складу: середовище RPMI-1640 (Gibco) із 4 ммоль/л L-глутаміну, 20 % ембріональної сироватки теляти (Gibco), 8 мкг/мл гентаміцину згідно зі стандартними методами роботи з клітинними штамми [16]. Процедуру повторювали 5–6 разів для того, щоб набрати необхідну кількість клітин (5·10⁴ кл/мл середовища). Клітини вирощували при постійній температурі 37 °С на покривних скельцях розміром 16×8 мм, які знаходилися на дні скляних пляшечок, до конфлуентного стану моношару (1–8 діб). Диференціацію міогенних клітин оцінювали у різні терміни культивування під оптичним мікроскопом «Axioscop» (West Germany) при збільшенні у 1000 разів за наступними показниками: загальна кількість клітин на площі препарату 0,05 мм², кількість малодиференційованих міобластів на площі препарату 0,05 мм², кількість мітозів, кількість високодиференційованих багатоядерних міосимпластів на площі усього препарату, які утворюються шляхом злиття міобластів, середня кількість ядер у міосимпластах. Впродовж 6–8 діб у культурі клітин спостерігали формування м'язових волокон: малодиференційовані міобласти об'єднувалися і утворювали багатоядерні структури – міосимпласти. Оцінка процесу диференціації міогенних клітин комплексна – за усіма показниками. Опромінювали клітини в дозі 10,0 Гр через 24 години після посадки.

2-меркаптобензотіазол (2-МБТ) додавали за 1 год до опромінення в концентрації 3,0 мкг/мл (за цієї концентрації спостерігали найвищий радіопротекторний ефект для клітин лінії L₉₂₉) та культивували впродовж 1–8 діб. Контролем слугували культури клітин без 2-МБТ.

Мікрофотографії отримані за допомогою цифрової камери DIGITAL CAMERA for Microscope Science Lab DCM 320 (USB 2.0), Resolution 3.5 Mpixels.

Статистичний аналіз вірогідності отриманих даних проводили за допомогою t-критерію Стьюдента [17], використовуючи комп'ютерні програми Microsoft Excel та Biostat.

Результати й обговорення. За результатами вивчення впливу 2-МБТ в діапазоні концентрацій 0,03–3,00 мкг/мл на морфофункціональні показники в культурі клітин (рис. 1–3) не було виявлено

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, ювілеї статистично достовірної зміни ($p \leq 0,05$) щільності клітинної популяції у моношарових культурах (рис. 1), а лише тенденцію до зміни при збільшенні вмісту реагенту.

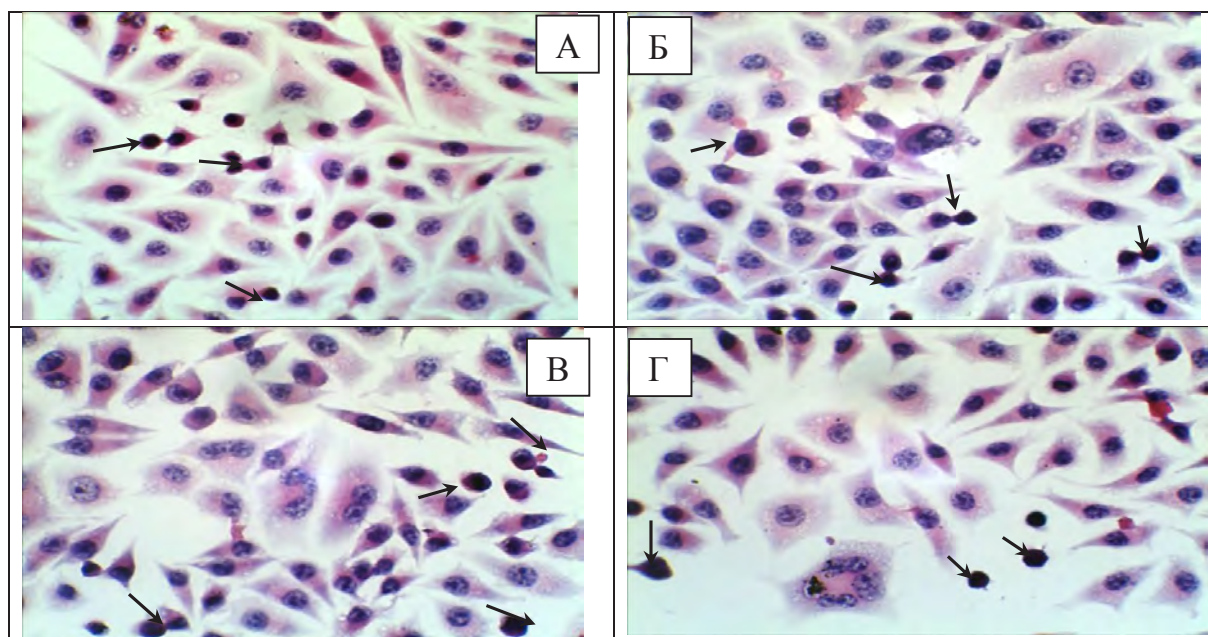
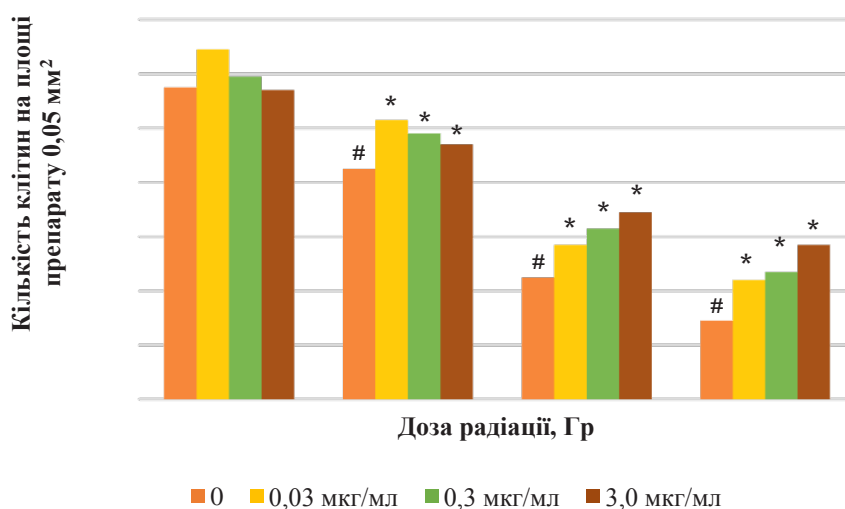


Рис. 1. Структурно-функціональна характеристика культури клітин лінії L₉₂₉ у контролі (А) та в присутності 2-МБТ у концентраціях 0,03 мкг/мл (Б), 0,30 мкг/мл (В) та 3,00 мкг/мл (Г). Щільність клітинної популяції не змінена, помітно велика кількість клітин на різних стадіях поділу (позначення чорними стрілками). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 1000$.



Примітки: 1. # – різниця достовірна порівняно з інтактними клітинами ($p \leq 0,05$); 2. * – різниця достовірна порівняно з опроміненням ($p \leq 0,05$).

Рис. 2. Фракція клітин, що вижили на 5 добу в моношарових культурах клітин L₉₂₉ при інкубації з 2-МБТ у різних концентраціях та після опромінення гамма-квантами ⁶⁰Со в різних дозах.

Водночас спостерігали для усіх застосованих концентрацій 2-МБТ стимуляцію мітотичної активності на термінальній (5 доба) стадії культивування (рис. 3). При аналізі кількості апоптотичних клітин у тест-системі (рис. 4) помітне статистично достовірне збільшення їх кількості при підвищенні концен-

трації реагенту. Цим можна пояснити сталу кількість клітин у культурі при істотному підвищенні мітотичної активності. Слід звернути увагу на тенденцію до зменшення (порівняно з інтактними культурами клітин) кількості полікаріоцитів за умови присутності в поживному середовищі 2-МБТ (рис. 3).

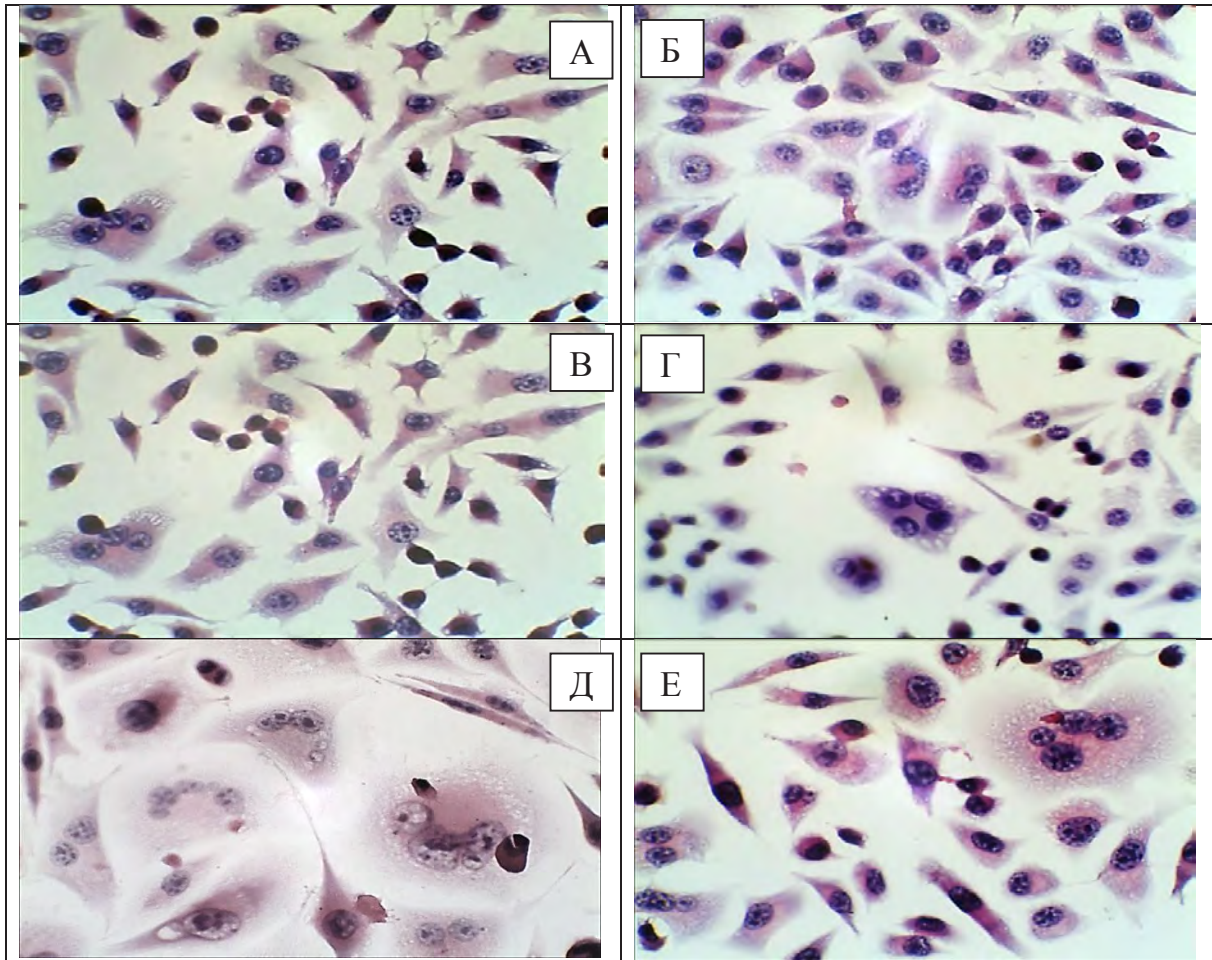
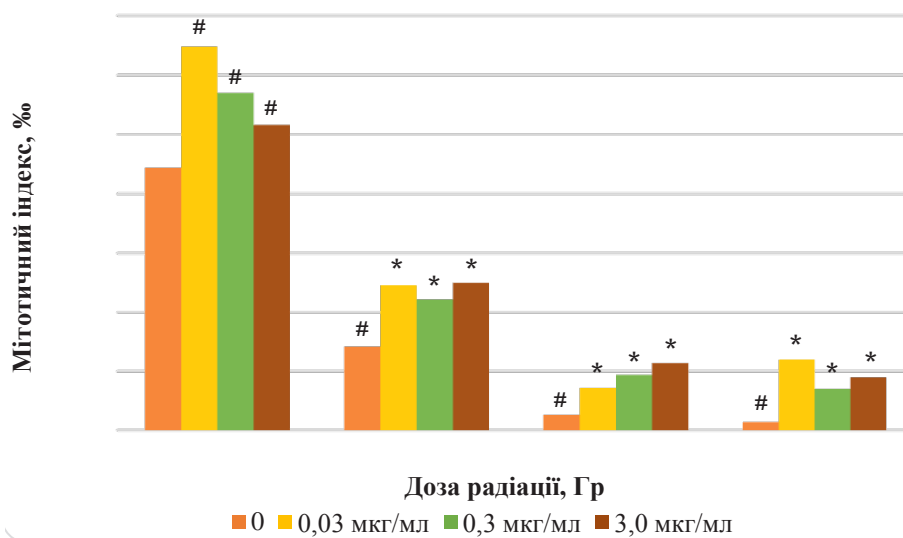


Рис. 3. Структурно-функціональна характеристика культури клітин лінії L₉₂₉ після опромінення в дозі 1 Гр (А), 5 Гр (В) й 10 Гр (С) та за поєднаної дії опромінення в дозах 1 Гр, 5 Гр і 10 Гр та 2-МБТ у концентрації 3,00 мкг/мл (Д), (Е) й (С) відповідно. Забарвлення гематоксилином та еозином. Збільшення ×1000.



Примітки: 1. # – різниця достовірна, порівняно з інтактними клітинами ($p \leq 0,05$); 2. * – різниця достовірна, порівняно з опроміненням ($p \leq 0,05$).

Рис. 4. Радіомодифікуючий вплив 2-МБТ у різних концентраціях на мітотичну активність клітин лінії L₉₂₉.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, ювілеї

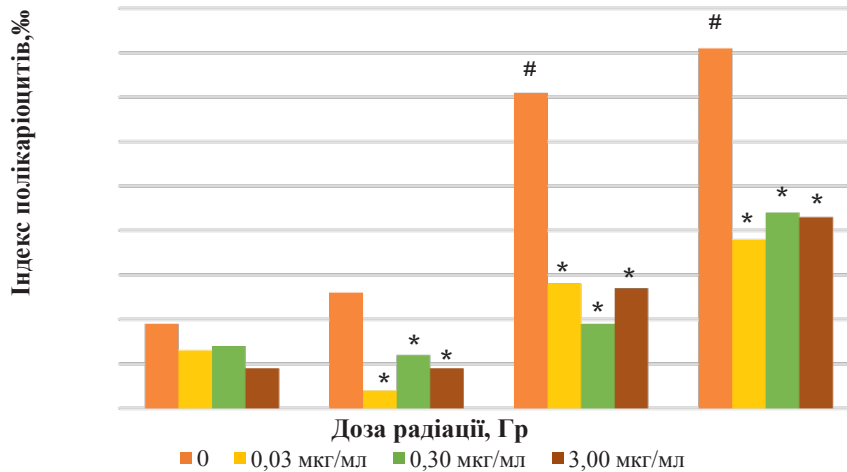
Після опромінення клітин гамма-квантами ^{60}Co в дозах 1, 5 та 10 Гр спостерігали дозозалежне зменшення показників життєздатності, а саме (див. рис. 2, 3, А, В, Д): щільність клітинної популяції зменшилась у 1,4–4 рази (відповідно до збільшення дози радіації), а мітотичний індекс – від 3 до 32 разів (див. рис. 3 та 4).

Водночас кількість атипкових полікаріоцитів підвищилась в 1,4–4 рази (див. рис. 3, 5), а кількість апоптотичних клітин із збільшенням дози опромінення зростає у 2–3 рази, порівняно з інтактними культурами клітин.

Слід зазначити, що в присутності 2-МБТ в опромінені культури клітин спостерігали (рис. 3, Б, Г, Е; рис. 2) збільшення кількості клітин та підвищення їх мітотичної активності (рис. 3, Б, Г, Е; рис. 4), водночас, значно меншу кількість полікаріоцитів

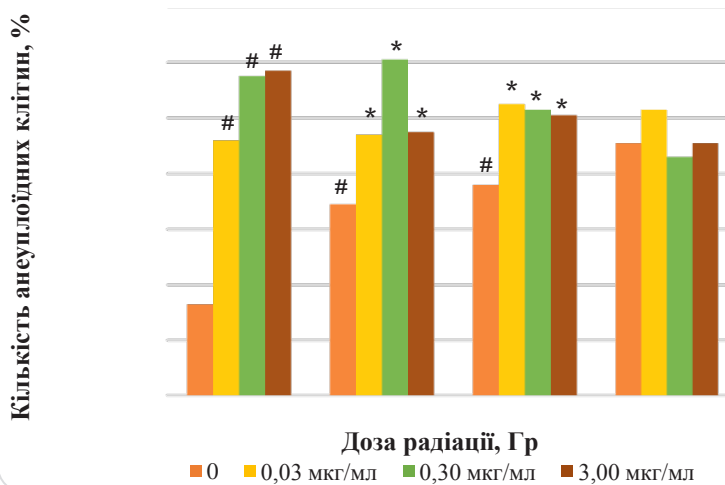
(рис. 3, Б, Г, Е; рис. 5), порівняно з опроміненням, що може вказувати на генопротекторні властивості реагенту. Згідно з літературними даними [18], атипкові багатоядерні клітини у культурі клітин лінії L_{929} вважають маркерами репродуктивної загибелі клітин.

Визначення рівня апоптозу у культурі опроміненіх клітин в присутності 2-МБТ (рис. 6) показало статистично достовірне збільшення кількості апоптотичних клітин тільки після опромінення в дозах 1 та 5 Гр ($p \leq 0,05$). Після опромінення клітин в дозі 10 Гр в присутності 2-МБТ статистично достовірних змін апоптозу не спостерігали, порівняно тільки з опроміненням. Загальновідомо, що першочергового значення при апоптозі при дії різних агентів набуває селективне видалення тих клітин, виживання яких загрозове для цілісного організму.



Примітки. 1. # – різниця достовірна порівняно з інтактними клітинами ($p \leq 0,05$); 2. * – різниця достовірна порівняно з опроміненням ($p \leq 0,05$).

Рис. 5. Дозова залежність індукції гігантських багатоядерних клітин у культурі клітин лінії L_{929} при інкубації з 2-МБТ у різних концентраціях та опроміненні гамма-квантами ^{60}Co в різних дозах.



Примітки. 1. # – різниця достовірна порівняно з інтактними клітинами ($p \leq 0,05$); 2. * – різниця достовірна порівняно з опроміненням ($p \leq 0,05$).

Рис. 6. Дозова залежність кількості апоптотичних клітин в культурі клітин лінії L_{929} при інкубації з 2-МБТ у різних концентраціях та опроміненні в дозах 1,5 та 10 Гр.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, ювілеї

Згідно зі способами оцінки ефективності радіопротекторів за відсотком загиблих клітин був розрахований коефіцієнт захисту залежно від концентрації 2-МБТ (рис. 7). Найвищі значення КЗ (0,31–0,36), спостерігали після опромінення клітин в дозі 1 Гр та за найвищої концентрації реаген-

ту – 3 мкг/мл. Ефективність захисту клітин при найнижчій концентрації 2-МБТ – 0,03 мкг/мл, зменшувалась із збільшенням дози опромінення. Аналогічну тенденцію, але менш виражену, спостерігали і для концентрації 0,3 мкг/мл.

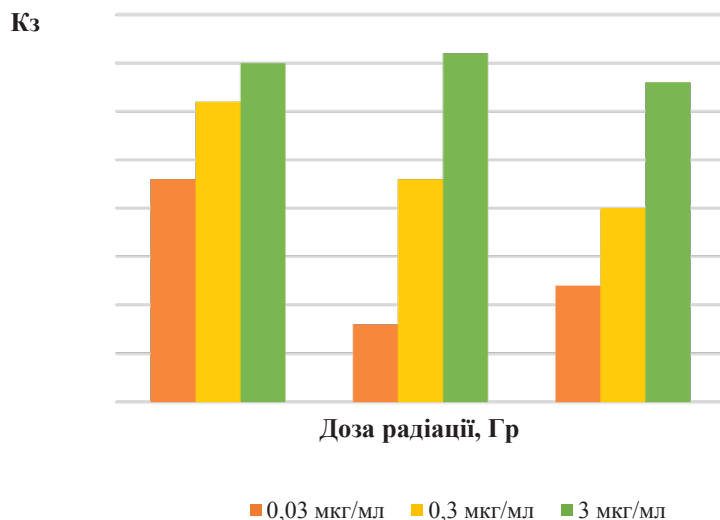


Рис. 7. Залежність коефіцієнта захисту при дії різних концентрацій 2-МБТ на опромінені в різних дозах клітини лінії L₉₂₉. По осі ординат КЗ – коефіцієнт захисту.

Дослідження диференціації ембріональних міогенних клітин щурів *in vitro* було одним із найважливіших етапів перевірки радіопротекторних властивостей 2-МБТ. Диференціація міогенних клітин *in vitro* в контролі характеризується злит-

тям малодиференційованих одноядерних веретеноподібних клітин впродовж 3–5 діб з утворенням багатоядерних високодиференційованих міосимпластів, які інколи набувають розгалуженої гілкоподібної форми (рис. 8).

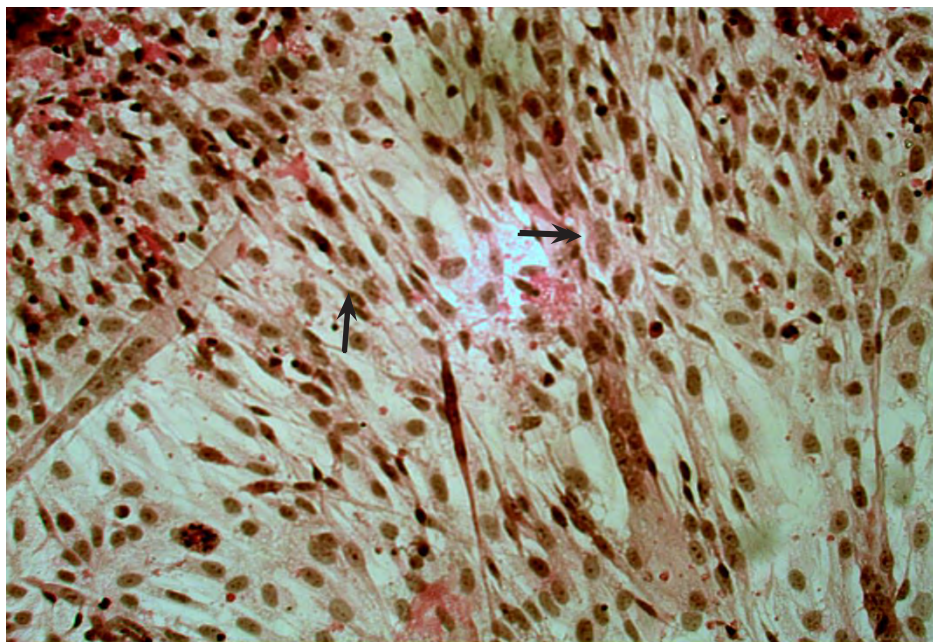


Рис. 8. Диференціація міогенних клітин новонароджених щурів у первинній культурі в контролі на 5 добу культивування. Міобласти веретеноподібної форми з видовженим ядром об'єднуються в стрічкоподібні багатоядерні структури – міосимпласти. Стрілками показані місця злиття міобластів. Фібробластоподібні клітини полігональної форми з округлим ядром. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 400$.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, ювілеї

В інтактних культурах клітин (рис. 9, А) на другу добу культивування спостерігали інтенсивний поділ клітин, що призводив до значного збільшення загальної кількості фібробластоподібних клітин та міобластів. Починаючи з третьої доби міобласти починали об'єднуватись і утворювати стрічкоподібні багатоядерні структури, розміри та кількість яких зростали у термін з п'ятої до восьмої доби. На 6 добу на препаратах вже спостерігали розгалужені міосимпласти з великою

кількістю ядер у них. Водночас загальна кількість клітин зменшувалась за рахунок злиття майже всіх міобластів у міосимпласти. Мітотична активність у ці терміни теж істотно зменшувалась.

У результаті дослідження було виявлено (рис. 9, Б), що інкубація міогенних клітин з 2-МБТ у концентрації 3,0 мкг/мл статистично достовірно не впливає на процес диференціації ембріональних міогенних клітин щурів (порівняно з інтактними культурами).

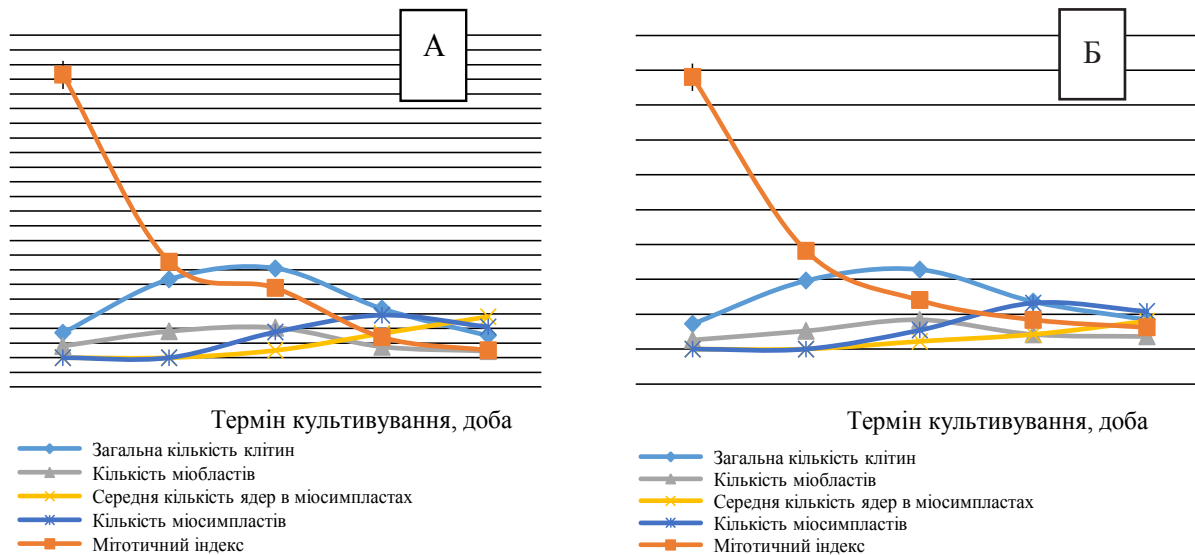


Рис. 9. Кінетика диференціації ембріональних міогенних клітин щурів *in vitro* в контролі (А) та при інкубації з 2-МБТ в концентрації 3,0 мкг/мл (Б). На основній осі ординат (зліва): щільність клітинної популяції – загальна кількість клітин на площі препарату 0,05 мм²; кількість міобластів на тій же площі препарату; на додатковій осі ординат (справа) – мітотичний індекс, %.

Опромінення культури міогенних клітин гамма-квантами ⁶⁰Co в дозі 10 Гр призвело до інактивації фібробластоподібних клітин та викликало загибель практично усіх міобластів, як найбільш радіочутливих малодиференційованих клітин, і диференціацію в культурі клітин не спостерігали

(рис. 10, А). Опромінення культури клітин в дозі 10 Гр в присутності 2-МБТ у концентрації 3,0 мкг/мл істотно змінило клітинний склад та морфологічну структуру культури, а саме: помітно значно більше мітотичних клітин, міобластів та міосимпластів невеликих розмірів.

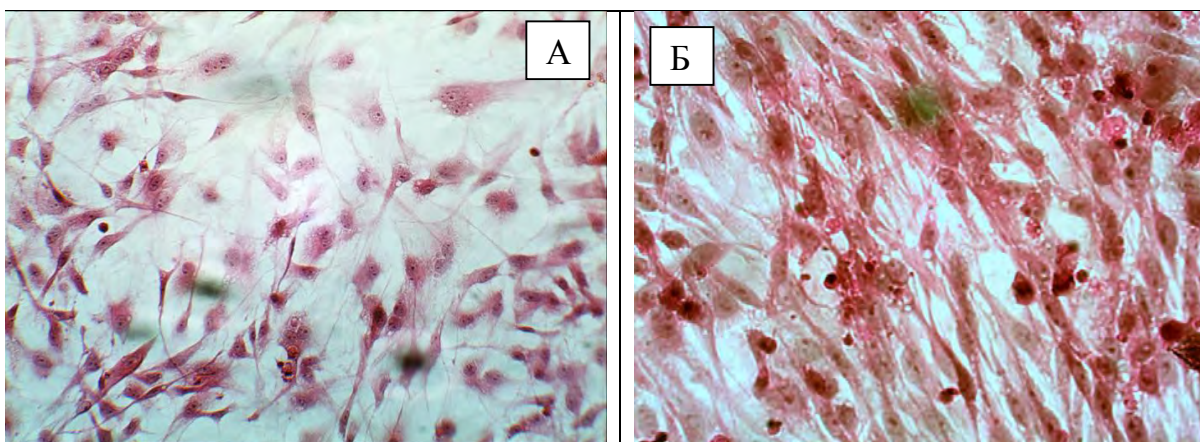


Рис. 10. Диференціація міогенних клітин новонароджених щурів у первинній культурі: після гамма-опромінення в дозі 10 Гр (А); при поєднанні опромінення в дозі 10 Гр та інкубації з 2-МБТ на 6 добу культивування (Б). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 400$.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, ювілеї

Як свідчать дані, відображені на рисунку 11, загальна кількість клітин після опромінення в сублетальній дозі зменшилась у 3,7 раза, порівняно з контролем, а мітотичний індекс – у 8 разів. Водно-

час, присутність у культурі опромінених клітин радіопротектора привела до підвищення проліферативної та мітотичної активності клітин в 2,6–5,1 раза відповідно (рис. 11).

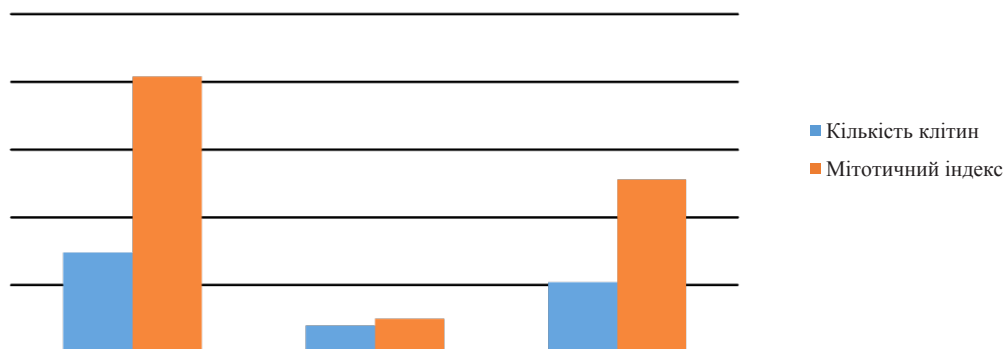


Рис. 11. Щільність клітинної популяції та мітотичний індекс ембріональних клітин щурів *in vitro* на 8 добу культивування в контролі, за опромінення в дозі 10 Гр та при поєднаній дії іонізуючої радіації в дозі 10 Гр і 2-МБТ в концентрації 3,0 мкг/мл.

Отримані результати експериментального дослідження за комплексом морфофункціональних показників у тест-системі культури проліферуючих клітин лінії L₉₂₉ показали, що 2-меркаптобензотіазол у фізіологічних для цих клітин концентраціях не мав мутагенних чи токсичних властивостей, проте підвищував життєздатність клітин, опромінених у середньо- та сублетальних дозах: збільшував їх виживання, мітотичну активність у моношарових культурах, порівняно тільки з опроміненням. Зменшення кількості атипичних багатоядерних клітин за цих умов може свідчити про його генопротекторні властивості.

Водночас, вивчення радіопротекторного впливу 2-МБТ на диференціацію міогенних клітин новонароджених щурів *in vitro* показало, що присутність під час гамма-опромінення в дозі 10 Гр 2-МБТ у концентрації 3,0 мкг/мл істотно підвищило виживання й життєздатність усіх типів клітин і їх мітотичну активність та викликало початкову фазу диференціації міогенних клітин, про що свідчила присутність міосимпластів невеликих розмірів.

Щодо ймовірних механізмів радіопротекторної дії 2-меркаптобензотіазолу на клітинному рівні, то, зважаючи на літературні дані [2, 5, 9] та результати власних досліджень можна стверджувати, що саме розрив дисульфідного зв'язку в молекулі реагенту з подальшим знешкодженням вільних перекисних радикалів, які утворюються при дії радіації, що у подальшому призводить до зрушень у метаболізмі опромінених клітин (пригнічення біосинтезу та стабілізації ДНК, зниження мітотичної активності, активація репаративних процесів), сприяє їх відновленню після опромінення та репопуляції.

Висновки. 1. Проведені дослідження показали, що 2-меркаптобензотіазол у фізіологічних для клітин концентраціях (3,00–0,003 мкг/мл) не змінює щільності клітинної популяції в моношарових культурах клітин, але підвищує мітотичну активність у термінальний період культивування (5–6 доба). Збільшення кількості апоптотичних клітин у цей період пояснює сталу кількість клітин у культурі.

2. Після опромінення клітин в дозах 1, 5 і 10 Гр спостерігали дозозалежне зменшення їх проліферативної та мітотичної активності й істотне зростання в культурі клітин кількості полікаріоцитів (у 4 рази), яких вважають маркерами репродуктивної загибелі. Збільшення рівня апоптозу в опромінених культурах проліферуючих клітин свідчить про радіогенний характер їх загибелі.

3. Виявлено, що інкубація клітин до та під час опромінення з 2-меркаптобензотіазолом зменшує радіоіндуковані ушкодження клітин: підвищує проліферацію та мітотичну активність, порівняно з дією тільки радіації. Зменшення кількості полікаріоцитів у культурі клітин вказує на генопротекторні властивості реагенту. Водночас, підвищений рівень апоптозу за цих умов свідчить про елімінацію ушкоджених радіацією клітин з культури.

4. Кількісна оцінка радіопротекторних властивостей 2-меркаптобензотіазолу у тест-системі культури клітин лінії L₉₂₉ показала, що найвищі показники коефіцієнта захисту (0,31–0,36) реагент показав при концентрації 3 мкг/мл при опроміненні в дозі 1 Гр. Водночас, фактор зменшення дози, розрахований за ЛД₅₀, за концентрації 3,00 мкг/мл був максимальний – 4.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, ювілеї

Встановлено, що в присутності 2-МБТ у концентрації 3,0 мкг/мл індукувалася диференціація в культурі міогенних клітин, опромінених в дозі 10 Гр, про що свідчила присутність міосимпласм невеликих розмірів, істотно підвищувалися ви-

живання та життєздатність усіх типів клітин і їх мітотична активність.

За сукупністю даних літератури та результатів власних досліджень можна вважати 2-меркаптобензотіазол реагентом з радіопротекторними властивостями для клітин *in vitro*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Узленкова Н. Є. Радіопротектори: сучасний стан проблеми [Текст] / Н. Є. Узленкова // Укр. Радіол. Журн. – 2014. – Т. XXII, Вип. 4. – С. 42–49.

2. Gudkov A. V. Radioprotection: smart games with death [Text] / A. V. Gudkov, E. A. Komarova // J. Clin. Invest. – 2010. – No. 120 (7). – P. 2270–2273. [PubMed].

3. Радіаційні ураження і радіопротектори [Текст] / М. Дружина, А. Мойсєєв, А. Липська, Ю. Гриневич // Вісн. НАН України. – 2005, № 4. – С. 17–24.

4. Бебешко В. Г. Радіопротектори, як засоби мінімізації наслідків Чорнобильської катастрофи [Текст] / В. Г. Бебешко, Д. А. Базики // Медичні наслідки аварії на Чорнобильській атомній електростанції / за ред. О. Ф. Возіанова, В. Г. Бебешка, Д. А. Базики. – К. : Діа, 2007. – С. 689–707.

5. Васин М. В. Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии [Текст] / М. В. Васин // Острые проблемы разработки противолучевых средств: консерватизм или модернизация : материалы Российской конференции, Москва, 2012 // Радиационная биол. Радиоэкол. – 2013. – Т. 53, № 5. – С. 459–467.

6. Котеров А. Н. Проблемы поиска средств противолучевой защиты человека в свете достижений генетики старения [Текст] / А. Н. Котеров // Острые проблемы разработки противолучевых средств: консерватизм или модернизация : материалы Российской конференции, Москва, 2012 // Радиационная биол. Радиоэкол. – 2013. – Т. 53, № 5. – С. 487–495.

7. Создание нового поколения радиозащитных средств на основе химических ингибиторов NO-синтазы [Текст] / А. А. Мандругин, Г. С. Борисова, М. В. Филимонова, Л. И. Шевченко // Материалы VII Съезда по радиационным исследованиям (радиобиология, радиозоология, радиационная безопасность) : тезисы докладов (Москва, 2014). – М. : РУДН, 2014. – С. 158.

8. Васин М. В. Радиомодуляторы как важный компонент биологической защиты от поражающего действия ионизирующего излучения [Текст] / М. В. Васин // Материалы VII Съезда по радиационным исследованиям (радиобиология, радиозоология, радиационная безопасность) : тезисы докладов (Москва, 2014). – М. : РУДН, 2014. – С. 136.

9. Расина Л. Н. Некоторые итоги и перспективы разработки противолучевых препаратов в ряду гетероциклических соединений [Текст] / Л. Н. Расина // Диагностика та профілактика негативних наслідків радіації : матеріали 3-го симпозиуму, Київ, 1997. – К. : Ін-т експери-

ментальної радіології НЦРМ АМН України, Міжнародна організація «Жіноча громада», 1997. – С. 196–200.

10. Гребенюк А. Н. Проблемы и перспективы современной радиационной фармакологии [Текст] / А. Н. Гребенюк // Материалы VII Съезда по радиационным исследованиям (радиобиология, радиозоология, радиационная безопасность) : тезисы докладов (Москва, 2014). – М. : РУДН. – 2014. – С. 8.

11. Оценка лечебной эффективности отечественных препаратов Г-КСФ в опытах на облученных собаках [Текст] / Л. М. Рождественский, Т. Г. Шлякова, Р. А. Щеголева [и др.] // Радиационная биол. Радиоэкол. – 2013. – Т. 53, № 1. – С. 47–54.

12. Васин М. В. Потенциальная роль фактора неравномерности поглощения энергии ионизирующего излучения в организме в эффективности противолучевых препаратов [Текст] / М. В. Васин // Мед. Радиол. и радиационная безопасн. – 2011. – Т. 56, № 4. – С. 60–70.

13. Зацепин В. В. Экспериментальная оценка радиозащитной эффективности комбинированного применения препаратов с различными механизмами противолучевого действия при остром облучении [Текст] / В. В. Зацепин // материалы VII Съезда по радиационным исследованиям (радиобиология, радиозоология, радиационная безопасность) : тезисы докладов, (Москва, 2014). – М. : РУДН, 2014. – С. 143.

14. Kouvaris J. R. Amifostine: The first selective-target and broad-spectrum radioprotector [Text] / J. R. Kouvaris, V. E. Kouloulis, L. J. Vlahos // The Oncologist. – 2007. – Vol. 12. – P. 738–747. [PubMed]

15. Kuna P. Amifostine (WR-2721) as a radio protector for the emergency workers [Text] / P. Kuna, L. Navratil, J. Singer // Сучасні проблеми радіаційних досліджень : матеріали 35-ої щорічної конференції Європейського товариства з радіаційних досліджень, Київ, 2006. – К. : Ін-т клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, 2007. – С. 211–223.

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

17. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием MS EXCEL [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : МОРИОН, 2000. – 320 с.

18. Календо Г. С. Ранние реакции клеток на ионизирующее излучения и их роль в защите и сенсибилизации [Текст] / Г. С. Календо. – М. : Энергоиздат. – 1982. – 96 с.

REFERENCES

1. Uzlenkova, N.E. (2014). Radioprotektory: suchasnyi stan problem [Radioprotectors: the current state of the problem]. *Ukr. radiol. zhurn. – Ukrainian Journal of Radiology*, XXII (4), 42-49 [in Ukrainian].
2. Gudkov, A.V., & Komarova, E.A. (2010). Radioprotection: smart games with death. *J. Clin. Invest.*, 120 (7), 2270-2273.
3. Druzhyna, M., Moisieiev, A., Lypyska, A., & Hrynevych, Yu. (2005). Radiatsiini urazhennia yak radioprotektory [Radiation damage and radioprotectors]. *Visn. NAN Ukrainy – Journal of NAS of Ukraine*, 4, 17-24 [in Ukrainian].
4. Bebesko, V.G. (2007). *Radioprotektory, yak zasoby minimizatsii i naslidky v Chornobylskii katastrofi [Radioprotectors as a means of minimizing the consequences of the Chernobyl disaster]*. Kyiv: DIA [in Ukrainian].
5. Vasin, M.V. (2013). Klassifikatsiya protivoluchevykh sredstv kak otrazhenie sovremennogo sostoyaniya i perspektivy razvitiya radiacionnoy farmakologii [Classification of radioprotective agents as a reflection of the current state and prospects of development of radiation pharmacology]. *Radiat. biol. Radioekol. – Radiation Biological Radioecology*, 53 (6), 459-468 [in Russian].
6. Koterov, A.N. (2013). Problemy poiska sredstv protivoluchevoy zashchity cheloveka v svetedostizhenii genetikistareniya [Problems of fund raising radioprotective protection rights in the light of aging genetics]. *Radiat. biol. Radioekol. – Radiation Biological Radioecology*, 53 (6), 487-495 [in Russian].
7. Mandrugina, A.A., Borisova, G.S., Filimonov, M.F., & Shevchenko, L.I. (2014). *Sozdanie novogo pokoleniya radiozashchitnykh sredstv na osnove khimicheskikh inhibitorov NO-sintetazy [Creating a new generation of radioprotective substances on the basis of chemical inhibitors of NO-synthase]*. Moscow: RUDN [in Russian].
8. Vasin, M.V. (2014). Radiomodulatory kak vazhnyy component biologicheskoy zashchity otporazhayushchego deystviya i oniziruyushchego izlucheniya [Radio modulators as an important component of biological protection against the damaging effects of ionizing radiation]. *Materials of VII congress of radiation research (radiobiology, radioecology, radiation safety): theses of reports*. Moscow: RUDN [in Russian].
9. Rasina, L.N. (1997). *Nekotorye itogi i perspektivy razrabotki protivoluchevykh preparatov v ryadu geterotsiklicheskikh soyedineniy. Diagnosis and prevention of adverse effects of radiation materials 3rd Symposium [Some results and prospects for the development of anti-inflammatory drugs in the range of heterocyclic compounds]*. Kiev: Institute of Experimental Radiology NCRM AMS Ukraine, International organization "Female community" [in Russian].
10. Grebenyuk, A.N. (2014). Problemy i perspektivy sovremennoy radiatsionnoy farmakologii [Problems and perspectives of modern radiation pharmacology]. *Materials of VII congress of radiation research (radiobiology, radioecology, radiation safety): theses of reports*. Moscow [in Russian].
11. Rozhdestvenskiy, L.M., Shlyakova, T.G., Shchegoleva, R.A. (2013). Otsenka lechebnoy effektivnosti otechestvennykh preparatov G-KSF v opytakh na obluchennykh sobakakh [Assessment of therapeutic efficacy of domestic preparations of G-CSF in experiments on dogs irradiated]. *Radiat. biol. Radioekol. – Radiation Biological Radioecology*, 53 (6), 47-54 [in Russian].
12. Vasin, M.V. (2011). Potentsialnaya rol faktora neravnomernosti pogloshcheniya energii i oniziruyushchego izlucheniya v organizme v effektivnosti protivoluchevykh preparatov [Potential role of the factor of uneven energy absorption of ionizing radiation in the body in the effectiveness of radioprotective drugs]. *Med. radiologiya i radiat. bezopasnost – Medical Radiology and Radiation Safety*, 56 (4), 60-70 [in Russian].
13. Zatsepin, V.V. (2014). *Eksperimentalnaya otsenka radiozashchitnoy effektivnosti kombinirovannogo primeneniya preparatov s razlichnymi mekhanizmami protivoluchevogo deystviya pri ostrom obluchenii [Experimental evaluation of radioprotective efficiency of the combined use of drugs with different mechanisms of radioprotective action in acute irradiation]*. Moscow: RUDN [in Russian].
14. Kouvaris, J.R., Kouloulis, V.E., & Vlahos, L.J. (2007). Amifostine: The first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *The Oncologist*, 12, 738-747.
15. Kuna, P., Navratil, L., & Singer, J. (2007). *Amifostine (WR-2721) as a radioprotector for the emergency workers*. Kyiv: In-t klitynoi biolohii ta henetychnoi inzhenerii NAN Ukrainy, 211-223.
16. Dyakonov, L.P. (Ed.). (2009). *Zhivotnaya kletka v kulture [Animal cell in culture (Methods and applications in biotechnology)]*. Moscow: "Sputnik+" [in Russian].
17. Lapach, S.N., Chubenko, A.V., & Babich, P.N. (2000). *Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniem MS EXCEL [Statistical methods in biomedical research using MS EXCEL]*. Kyiv: MORION [in Russian].
18. Kalendo, G.S. (1982). *Rannie reaktsii kletok na ioniziruyushchie izlucheniya i ikh rol v zashchite i sensibilizatsii [Early cell response to ionizing radiation and their role in protecting and sensitization]*. Moscow: Energoizdat [in Russian].

РАДИОЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА 2-MERCAPTOBENZOTIAZOЛА НА КЛЕТКИ *IN VITRO*

©К. М. Литвинчук¹, Г. И. Лавренчук¹, В. Р. Гурандо², И. Н. Клищ³, А. О. Ковальчук³

ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины»¹

Ужгородский национальный университет²

ГБУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МОЗ Украины»³

РЕЗЮМЕ. Целью работы было исследование радиопротекторных свойств 2-меркаптобензотиазола в тест-системах первичной и перевиваемой культур пролиферирующих клеток.

Материал и методы. Использовали цитологические и статистические методы.

Результаты. При инкубации перевиваемых клеток линии L₉₂₉ с 2-меркаптобензотиазолом в диапазоне концентраций 0,03–3,00 мкг/м не было выявлено статистически достоверного изменения ($p \leq 0,05$) плотности клеточной популяции в монослойных культурах. В то же время наблюдали для всех примененных концентраций реагента стимуляцию митотической активности на терминальной (5 сутки) стадии культивирования. Облучение клеток гамма-квантами ⁶⁰Co в дозах 1, 5 и 10 Гр привело к дозозависимым морфофункциональным изменениям в культуре клеток. Облучение клеток в присутствии 2-меркаптобензотиазола существенно уменьшило негативное влияние радиации на показатели жизнеспособности клеток и их дифференциацию в культуре.

Выводы. Количественная оценка радиопротекторных свойств 2-меркаптобензотиазола в тест-системах культуры миогенных клеток и линии L₉₂₉ (фибробластоподобные клетки) показала, что наивысшие показатели коэффициента защиты (0,31–0,36) реагент показал при концентрации 3 мкг/мл при облучении в дозе 1 Гр, а фактор уменьшения дозы был максимальный – 4, при концентрации 3,00 мкг/мл. По совокупности данных литературы и результатов собственных исследований можно считать 2-меркаптобензотиазол реагентом с радиопротекторными свойствами для клеток *in vitro*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ионизирующее излучение; радиопротекторы; культура клеток; пролиферация; митоз; дифференциация миогенных клеток; апоптоз.

2-MERCAPTOBENZOTHIAZOLE RADIOPROTECTIVE EFFECT ON *IN VITRO* CELL CULTURE

©K. M. Litvinchuk¹, H. Yo. Lavrenchuk¹, V. R. Gurando², I. M. Klishch³, A. O. Kovalchuk³

National Scientific Center of Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine¹

Uzhhorod National University²

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University³

SUMMARY. Aim: to study the radioprotective properties of 2-mercaptobenzothiazole on proliferating cell culture test system.

Material and Methods. Cytological, statistics.

Results. Upon the incubation of inoculated cellline L₉₂₉ with 2-mercaptobenzothiazole in the concentration range 0.03–3.00 µg/mL statistically significant change ($p \leq 0.05$) of cell population density in mono layer cultures was not found. At the same time for all the applied reagent concentrations stimulation of mitotic activity in the terminal (5th day) stage of cultivation was observed. Exposure of cells by gamma-quanta of ⁶⁰Co in doses of 1, 5 and 10 Gy led to dose-dependant morphological changes in cell culture. The irradiation of cells in the presence of 2-mercaptobenzothiazole significantly reduced the negative effect of radiation on the indicators of vitality of cells and their differentiation in culture.

Conclusions. Quantitative evaluation of radioprotective properties of 2-mercaptobenzothiazole in the test systems of culture of myogenic cells as well as in the L₉₂₉ line (fibroblast cells) revealed that the highest coefficients of protection (0.31–0.36) and maximum level of factor of dose reduction (4) were observed at 3 mg/ml reagent concentration (irradiation dose – 1 Gy). According to the literature data and our research results, 2-mercaptobenzothiazole might be considered as a reagent with radioactive properties for cells *in vitro*.

KEY WORDS: ionizing radiation; radioprotectors; cell culture; proliferation; mitosis; differentiation of myogenic cells; apoptosis.

Отримано 20.02.2018