

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

КОНОВАЛЕНКО СЕРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 616-006.6.577.344

ДИСЕРТАЦІЯ

**ПОДОЛАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ
ДО ДОКСОРУБІЦИНУ ЗА УМОВ ЛАЗЕРНОГО ОПРОМІНЕННЯ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

222 - Медицина

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Коноваленко С.В.

Науковий керівник: Чехун Василь Федорович, академік НАН України,
професор, доктор медичних наук

Київ – 2023

АНОТАЦІЯ

Коноваленко С.В. Подолання резистентності клітин раку молочної залози до доксорубіцину за умов лазерного опромінення (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» зі спеціальності 222 «Медицина» (онкологія) – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, 2023.

Рак молочної залози (РМЗ), за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), є найпоширенішим різновидом раку за кількістю нових випадків - 2,26 млн у 2020 році, тому, вочевидь, РМЗ це найактуальніша медико-соціальна проблема [1]. В даний час існує розуміння молекулярно-генетичної природи злоякісного росту та ролі спадкових факторів у схильності до розвитку РМЗ, продовжуються клінічні та експериментальні дослідження з метою підвищення ефективності лікування цієї форми раку.

Перспективним напрямом подолання резистентності пухлин до хіміотерапевтичних впливів є приєднання до лікувальних протоколів додаткових протипухлинних чинників: використання ліпосомальних носіїв, наночастинок, гіпертермії, електромагнітного та лазерного опромінення. Зокрема, низькоінтенсивне лазерне випромінювання при використанні методу фотобіомодуляції (ФБМ) може зіграти синергетичну роль разом із хіміотерапією за рахунок підвищення накопичення в малігнізованих тканинах цитостатичних препаратів та підсилення токсичності останніх. Однак слід зазначити, що на сьогодні поки що не досліджено ефекти застосування лазерного випромінювання як ад'юванта основних хіміотерапевтичних препаратів, зокрема доксорубіцину, з метою подолання резистентності пухлинних клітин до хіміотерапії. У дисертаційній роботі вперше приділено увагу можливостям впливу на протипухлинну активність доксорубіцину по відношенню до чутливих і резистентних клітин РМЗ з використанням червоного та інфрачервоного лазерного випромінювання.

В серії експериментів встановлено, що лазери низької енергії відіграють

роль ад'ювантних модулюючих факторів у підвищенні протипухлинної ефективності доксорубіцину. У резистентній до доксорубіцину клітинній лінії MCF-7/Dox вплив поєднаної дії лазерного опромінення різних режимів та різних доз Dox призвів до зменшення проліферативного потенціалу. Слід зазначити, що вплив саме інфрачервоного світла ($\lambda 810$ нм) у поєднанні з хіміотерапевтичним чинником у дозі 2,0 мкг/мл викликав пригнічення експресії Ki-67 до рівня $175,2 \pm 5,1$ балів H-Score, що на 33 % менше за показник у групі контролю. Крім того, тенденція до зниження експресії Ki-67 у клітинах MCF-7/Dox після застосування меншої дози цитостатика (0,5 мкг/мл) та інфрачервоного лазера свідчить про синергічну дію фотобіомодуляції та доксорубіцину.

У дослідженнях вперше доведено, що інфрачервоне лазерне опромінення може створювати умови для подолання клітинами PM3 апоптотичного порогу. При вивченні поєданого впливу лазерного опромінення і доксорубіцину на резистентну культуру MCF-7/Dox, зафіксоване підвищення експресії білків-регуляторів Вах та p53. Важливо акцентувати, що такий ефект спостерігався при використанні обох концентрацій доксорубіцину: 2,0 мкг/мл та 0,5 мкг/мл. Якщо у контролі експресія p53 дорівнювала $35,2 \pm 3,1$ балів H-Score, то після дії доксорубіцину (0,5 мкг/мл) та лазера з довжиною хвилі 660 нм експресія цього маркера зросла до $62,6 \pm 3,4$ балів H-Score.

В дисертаційній роботі вперше описано вплив поєданого застосування доксорубіцину і інфрачервоного лазерного опромінення на розподіл клітин за фазами клітинного циклу. Дослідження показали, що лазерне опромінення здатне модулювати біологічну поведінку пухлинних клітин у такий спосіб, що вони стають менш активними з точки зору готовності до поділу – про це свідчить значно менша питома вага клітин у фазах S та G2/M і значно більша у фазах G0/G1 у порівнянні з контролем. Якщо в контролі кількість клітин у фазі G0/G1 сягала 23 %, а більшість клітин перебували у S та G2/M фазах відповідно, то при застосуванні доксорубіцину кількість клітин у G0/G1 помітно збільшилась до показника 49,9 %, а питома вага тих що перебувають у фазах S та G2/M знизилася до 23,2 та 26,2 % відповідно.

Отримані результати вперше показали, що інфрачервоне лазерне опромінення у поєднанні з доксорубіцином здатне модулювати експресію цикліну, який залучений у процеси регуляції клітинного циклу. Найбільш помітне зменшення експресії цикліну D1, спостерігалось після застосування доксорубіцину у поєднанні з лазерним опроміненням: до $37,2 \pm 2,12$ %, що в середньому на 27,48 % менше ніж у контролі. Зменшення рівня експресії цього маркера саме у групі «810 + DOX» дозволяє обґрунтовано припустити, що інфрачервоний лазер діє з хіміотерапевтичним агентом у синергії. Також встановлено, що коли у досліджуваних групах клітин MCF7/DOX доксорубіцин був поєднаний із інфрачервоним лазерним опроміненням, відмічалось зростання експресії p21: до $141,2 \pm 4,14$ балів H-Score. Цей результат представляється важливим, адже показник експресії у групі «810+ DOX» на 32,75 % вищий за такий у групі «DOX» та на 76,5 % вищий ніж у групі контролю.

Результати оцінки цитоморфологічних змін у мікропрепаратах за допомогою світлової мікроскопії підтвердили попередні висновки про те, що лазерне випромінювання створює умови для подолання резистентності пухлинних клітин до доксорубіцину. Слід зазначити, що саме вплив інфрачервоного лазерного опромінення у поєднанні з DOX спричинив такі цитоморфологічні зміни, які можна оцінювати як критичні для подальшої виживаності клітин резистентної до доксорубіцину культури.

Наприкінці проведеної дослідницької роботи кристалізується висновок, що лазерне опромінення інфрачервоного спектру, яке діє як додатковий фактор впливу разом з хіміопрепаратом, модулює каскади біологічних реакцій у резистентних до доксорубіцину клітинах таким чином, що вони стають більш чутливими до цитостатику. Отримані результати відкривають перспективу подолання резистентності пухлинних клітин до хіміотерапії шляхом приєднання до неї інфрачервоного лазерного опромінення.

Ключові слова: рак молочної залози, хіміотерапія, доксорубіцин, пухлинні клітини, MCF-7, резистентність, лазерне опромінення, фотобіомодуляція, інфрачервоний лазер, ефективність, апоптоз.

SUMMARY

Konovalenko S.V. Overcoming resistance of breast cancer cells to Doxorubicin under conditions of laser irradiation (experimental study). – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the field of study 22 "Health care" in the specialty 222 "Medicine" (Oncology)– RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2023.

Breast cancer (BC), according to the World Health Organization (WHO), is the most common type of cancer in terms of the number of new cases - 2.26 million in 2020, therefore, obviously, breast cancer is the most urgent medical and social problem. Currently, there is an understanding of the molecular and genetic nature of malignant growth and the role of hereditary factors in the predisposition to the development of breast cancer, and clinical and experimental research is ongoing to improve the effectiveness of the treatment of this form of cancer.

A promising way to overcome the resistance of tumors to chemotherapeutic effects is to add additional antitumor factors to treatment protocols: the use of liposomal carriers, nanoparticles, hyperthermia, electromagnetic and laser irradiation. In particular, low-intensity laser radiation when using the photobiomodulation (PBM) method can play a synergistic role together with chemotherapy by increasing the accumulation of cytostatic drugs in malignant tissues and enhancing the toxicity of the latter. However, it should be noted that the effects of using laser radiation as an adjuvant to the main chemotherapeutic drugs, in particular Doxorubicin, in order to overcome the resistance of tumor cells to chemotherapy, have not yet been investigated.

In the dissertation, for the first time, attention was paid to the possibilities of influencing the antitumor activity of Doxorubicin in relation to sensitive and resistant breast cancer cells using red and infrared laser radiation.

In a series of experiments, it was established that the laser plays the role of an adjuvant modulating factor in increasing the antitumor effectiveness of Doxorubicin.

In the Doxorubicin-resistant cell line MCF-7/Dox, the combined effect of laser irradiation of different modes and different doses of DOX led to a decrease in the proliferative potential. It should be noted that exposure to infrared light ($\lambda 810$ nm) in combination with a chemotherapeutic factor at a dose of $2.0 \mu\text{g/ml}$ caused inhibition of Ki-67 expression to the level of 175.2 ± 5.1 H-Score points, which is 33% less for the indicator in the control group. In addition, the tendency to decrease Ki-67 expression in MCF-7Dox cells after the application of a lower dose of cytostatic ($0.5 \mu\text{g/ml}$) and infrared laser indicates a synergistic effect of photobiomodulation and Doxorubicine.

Research has proven for the first time that infrared laser irradiation can create conditions for breast cancer cells to overcome the apoptotic threshold. When studying the combined effect of laser irradiation and Doxorubicin on the resistant MCF-7/Dox culture, an increase in the expression of regulatory proteins Bax and p53 was recorded. It is important to emphasize that this effect was observed when using both concentrations of Doxorubicin: $2.0 \mu\text{g/ml}$ and $0.5 \mu\text{g/ml}$. If in the control the expression of p53 was equal to 35.2 ± 3.1 H-Score points, then after the action of Doxorubicin ($0.5 \mu\text{g/ml}$) and a laser with a wavelength of 660 nm, the expression of this marker increased to 62.6 ± 3.4 points H-Score.

The effect of the combined use of Doxorubicin and infrared laser irradiation on the distribution of cells by phases of the cell cycle is described for the first time in the dissertation. Studies have shown that laser irradiation is able to modulate the biological behavior of tumor cells in such a way that they become less active in terms of readiness for division - this is evidenced by a significantly lower specific weight of cells in the S and G2/M phases and significantly higher in the G0/G1 compared to control. If in the control the number of cells in the G0/G 1 phase reached 23%, and the majority of cells were in the S and G2/M phases, respectively, then when Doxorubicin was used, the number of cells in G0/G1 significantly increased to 49.9%, and the specific weight those in the S and G2/M phases decreased to 23.2 and 26.2%, respectively.

The obtained results showed for the first time that infrared laser irradiation in combination with Doxorubicin is able to modulate the expression of cyclin, which is

involved in the processes of cell cycle regulation. The most noticeable decrease in the expression of cyclin D1 was observed after the use of Doxorubicin in combination with laser irradiation: up to $37.2 \pm 2.12\%$, which is on average 27.48% less than in the control. The decrease in the level of expression of this marker in the "810 + DOX" group allows us to reasonably assume that the infrared laser acts synergistically with the chemotherapeutic agent. It was also established that when Doxorubicin was combined with infrared laser irradiation in the studied groups of MCF7/Dox cells, an increase in p21 expression was noted: up to 141.2 ± 4.14 H-Score points. This result is important, because the expression index in the "810+ DOX" group is 32.75% higher than that in the "DOX" group and 76.5% higher than in the control group.

The results of the evaluation of cytomorphological changes in micropreparations using light microscopy confirmed the previous conclusions that laser radiation creates conditions for overcoming the resistance of tumor cells to Doxorubicin. It should be noted that it was the effect of infrared laser irradiation in combination with DOX that caused such cytomorphological changes, which can be assessed as critical for the further survival of cells in a culture resistant to Doxorubicin.

At the end of the research work, the conclusion crystallized that laser irradiation of the infrared spectrum, which acts as an additional factor of influence together with the chemotherapy drug, modulates the cascades of biological reactions in Doxorubicin-resistant cells in such a way that they become more sensitive to cytostatics. The obtained results open the prospect of overcoming the resistance of tumor cells to chemotherapy by adding infrared laser irradiation to it.

Key words: breast cancer, chemotherapy, Doxorubicin, tumor cells, MCF-7, resistance, laser irradiation, photobiomodulation, infrared laser, efficiency, apoptosis.

Список публікацій здобувача

1. Konovalenko S, Protsenko V. Cytomorphological changes in MCF7-DOX cells and their correlation with the activity of the cycle regulator p21 after combined exposure to infrared laser and Doxorubicin. *Archive Euromedica*. 2023; 13(1): 01-08. doi: 10.35630/2023/13/1.215
2. Prokopenko I, Konovalenko S. Red laser photodynamic therapy of melanoma B16 in experimental model in vivo. *Archive Euromedica*. 2023; 13(3): 01-07. doi: 10.35630/2023/13/3.304
3. С.В. Коноваленко, Т.В. Задворний. Поєднання лазерного опромінення і доксорубіцину як фактор індукції апоптозу пухлинних клітин. *Онкологія*. 2022; 26(3): 120-126. doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-24-3-2022-g.10669
4. С.В. Коноваленко, Г.В. Діденко, О.О. Круць, І.В. Прокопенко. Вивчення in vitro впливу лазерного опромінення у поєднанні з хіміотерапією на клітини карциноми Ерліха та макрофаги. *Онкологія*. 2022; 24(1): 20-25. doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-24-1-2022-g.10352
5. Konovalenko S, Protsenko V, Solonitsyn Y., Osadchuk T., Konovalenko V, Omelchenko T. Effect of bioactive glass-based composite and low energy laser on bone regeneration in an experimentally induced bone defect. *Archive Euromedica*. 2022; 12(2): 75-80. doi: 10.35630/2199-885X/2022/12/2.19
6. Konovalenko S, Lykhova O, Chepurna O, Prokopenko I, Naleskina L, Chekhun V. Study of the laser radiation effect in combination with Doxorubicin on the survival of MCF7 and MCF7/Dox culture cells. *Eureka Health Sciences*. 2022; (4): 112-121.
7. О.О. Лихова, С.В. Коноваленко, О.М. Чепурна. Визначення впливу та оптимізація параметрів проведення фотобіомодуляції та фотодинамічної терапії для культур клітин раку передміхурової та молочної залози різного ступеня злоякісності. *Онкологія*. 2021; 23(4): 190-194.
8. О.М.Чепурна, І.В.Прокопенко, С.В.Коноваленко. Сучасні досягнення та перспективи використання низькоінтенсивного лазерного випромінювання в лікуванні онкологічних хворих // Шляхи та перспективи розвитку

експериментальної онкології в Україні (під ред. академіка НАНУ В.Ф.Чехуна) - 2021. 252 - 266.

9. Коноваленко С.В., Г.В. Діденко Г.В., Круць О.О., Чепурна О.М., Прокопенко І.В. Протипухлинна ефективність поєданого впливу доксорубіцину та лазерного опромінення. Матеріали XIV з'їзду онкологів та радіологів України, 2021. С.384 – 385.
10. S. Konovalenko, L. Naleskina. Cytomorphological characteristics of MCF7-DOX breast adenocarcinoma culture cells after the influence of photobiomodulation in combination with Doxorubicin. International scientific integration '2022: 21 - 25.
11. Konovalenko S.V., Lykhova O.O. The results of a study of the combined effects of Doxorubicin and laser irradiation on the survival of MCF7 and MCF7/Dox culture cells. Proceedings of All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell biology (Abstract book) 2021: 129.
12. Konovalenko S.V. The effect of infrared laser and low doses of Doxorubicin on the cytomorphological characteristics of MCF-7/Dox tumor cells. Матеріали шостої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології». Збірник наукових робіт. 2022: 79 – 81.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	13
ВСТУП	14
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	21
1.1 Передумови застосування лазерного випромінювання для підвищення ефективності конвенціональної протипухлинної терапії	21
1.2 Сучасні уявлення про механізми впливу лазерного опромінення на нормальні та злоякісно трансформовані клітини	25
1.3 Вплив лазерного опромінення на ефективність протипухлинних препаратів	30
1.4 Перспективи застосування лазерного опромінення для оптимізації медикаментозного лікування хворих на рак	34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	40
2.1 Характеристика клітин ліній РМЗ та умови їх культивування	40
2.2 Оцінка життєздатності клітин в системі <i>in vitro</i>	40
2.3 МТТ-тест	41
2.4 Цитоморфологічні дослідження	41
2.5 Імуноцитохімічний метод	42
2.6 Оцінка впливу на клітинний цикл	44
2.7 Методика опромінення пухлинних клітин	44
2.8 Методи статистичної обробки даних	46
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	47
3.1 Підбір режимів опромінення та доз цитостатика для клітин MCF-7 та MCF-7/Dox	47
3.1.1 Визначення режимів лазерного опромінення для клітин ліній MCF-7 та MCF-7/Dox	47
3.1.2 Визначення ефективних доз доксорубіцину для клітин ліній MCF-7 та MCF-7/Dox	51

3.2	Дослідження цитотоксичної активності доксорубіцину та лазерного опромінення по відношенню до клітин MCF-7 та MCF-7/Dox	52
3.2.1	Вивчення впливу доксорубіцину та лазерного випромінювання по відношенню до клітин лінії MCF-7	52
3.2.2	Вивчення впливу доксорубіцину та лазерного випромінювання по відношенню до клітин лінії MCF-7/Dox	56
3.3	Вивчення цитоморфологічних ефектів впливу червоного та інфрачервоного лазерного опромінення у поєднанні з доксорубіцином на чутливі та резистентні клітини раку молочної залози	59
3.3.1	Дослідження цитоморфологічних особливостей чутливих до цитостатиків клітин раку молочної залози людини лінії MCF-7	60
3.3.2	Дослідження цитоморфологічних особливостей резистентних до цитостатиків клітин раку молочної залози людини лінії MCF-7/Dox	70
3.4	Молекулярно-біологічні механізми дії лазерного опромінення та доксорубіцину на клітини раку молочної залози людини з різною чутливістю до цитостатиків	81
3.4.1	Дослідження впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на проліферативний потенціал клітин раку молочної залози людини з різною чутливістю до цитостатиків	81
3.4.2	Дослідження впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на показники експресії білків-регуляторів апоптозу у клітинах раку молочної залози людини лінії MCF-7	83
3.4.3	Дослідження впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на показники клітинного циклу та експресію білків-регуляторів клітинного циклу у клітинах раку молочної залози людини лінії MCF-7	85

3.4.4	Дослідження впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на показники експресії білків-регуляторів апоптозу у клітинах раку молочної залози людини лінії MCF-7/Dox	92
3.4.5	Дослідження впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на показники клітинного циклу та експресію білків-регуляторів клітинного циклу у клітинах раку молочної залози людини лінії MCF-7/Dox	94
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ		101
ВИСНОВКИ		117
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		119
ДОДАТОК А		139

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активні форми кисню

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ІЦХ – імуноцитохімія

ЛНЕ – лазери низької енергії

МкАТ – моноклональні антитіла

РМЗ – рак молочної залози

РНК – рибонуклеїнова кислота

ФБМ – фотобіомодуляція

ФБМТ – фотобіомодуляційна терапія

ФДТ – фотодинамічна терапія

ФС – фотосенсибілізатор

ХТ – хіміотерапія

ЦСО – цитохром С оксидаза

DOX – доксорубіцин

MCF-7 – культура аденокарциноми молочної залози, чутлива до доксорубіцину (Michigan Cancer Foundation)

MCF-7/Dox – культура аденокарциноми молочної залози, резистентна до доксорубіцину (Michigan Cancer Foundation)

NO – оксид азоту

OPN – остеопонтин

ROS – reactive oxygen species

WALT – World Association for Laser Therapy

ВСТУП

Актуальність теми. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO 2023), рак є другою причиною смерті в усьому світі, на нього припадало майже 10 мільйонів смертей у 2020 році. Найпоширенішим різновидом раку за кількістю нових випадків є рак молочної залози (РМЗ) - 2,26 млн випадків, тому, вочевидь, РМЗ - найактуальніша медико-соціальна проблема. В даний час розроблені сучасні уявлення про молекулярно-генетичну природу злоякісного росту та значення спадкових факторів у схильності до розвитку РМЗ, продовжуються клінічні та експериментальні дослідження з метою підвищення ефективності лікування цієї форми раку [1,2]. Вдосконалення підходів до лікування хворих на РМЗ залишається однією з актуальних проблем онкології не лише у зв'язку з високим рівнем захворюваності, але й зростанням кількості пацієнток з резистентними до хіміотерапії формами пухлин. Зазначене свідчить про необхідність подальших досліджень, присвячених вивченню фундаментальних аспектів даної онкологічної патології. Розвиток фенотипу медикаментозної резистентності – складний процес, в результаті якого клітина набуває нових властивостей, що відображається як на морфологічному рівні, так і на зміні молекулярних, фенотипових та біохімічних характеристик.

Перспективним напрямом подолання резистентності пухлин до цитостатиків є приєднання до лікувальних протоколів додаткових протипухлинних чинників: використання ліпосомальних носіїв, наночастинок, гіпертермії, електромагнітного та лазерного опромінення. Зокрема, встановлено, що низько інтенсивне лазерне випромінювання при використанні методу фотобіомодуляції (ФБМ) може чинити синергетичну роль разом із хіміотерапією за рахунок підвищення накопичення в малігнізованих тканинах цитостатичних препаратів та підвищення їх цитотоксичних ефектів. Викликає інтерес той факт, що ФБМ інфрачервоного спектру може реалізовувати фототоксичні ефекти без генотоксичного чи мутагенного впливу, сприяючи загибелі злоякісно трансформованих клітин шляхом аутофагії та апоптозу за рахунок ініціації вироблення активних форм кисню (АФК) [21,22].

Нещодавно було повідомлено про результати застосування лазерного опромінення низької енергії, яке пригнічувало проліферацію клітин, посилювало апоптоз, гальмувало міграцію та інвазію клітин. Виявлено, що зазначені ефекти обумовлені накопиченням АФК та активацією p53, що призводить до пошкодження ДНК. Крім того встановлено, що фотобіомодуляція сприяє аутофагії у лініях клітин остеосаркоми людини [25,26].

Такі дані дозволяють припустити, що лазерне випромінювання може стати тим додатковим чинником, який потенційно може підвищити чутливість пухлинних клітин до цитостатиків, в тому числі доксорубіцину.

У 2023 році вперше опубліковано результати вивчення ефективності поєднаного застосування лазерного випромінювання із імунотерапією [27]. В експериментах *in vitro* та *in vivo* встановлено, що комбінація сапорин-кон'югованого цетуксимабу та лазерного опромінення із довжиною хвилі 650 нм призводить до підвищення цитотоксичних ефектів останнього на лініях клітин A431, A549 та MCF7.

Однак слід зазначити, що на сьогодні поки що не досліджено ефекти застосування лазерів як ад'ювантів основних хіміотерапевтичних препаратів, зокрема доксорубіцину, з метою подолання резистентності та підвищення ефективності хіміотерапії [30].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертація виконувалась в рамках науково-дослідних робіт Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (2017-2021 рр., № держреєстрації 0117U002034) та «Роль маркерів ремоделювання кісткової тканини у формуванні ступеня злоякісності найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень» (2019-2023 рр., № держреєстрації 0118U005468).

Мета дослідження.

Дослідити механізми дії лазерного опромінення на клітини раку молочної залози людини з різною чутливістю до цитостатиків в модельній системі *in vitro* та обґрунтувати можливість його використання для підвищення цитотоксичної активності доксорубіцину та подолання фенотипу медикаментозної резистентності.

Задачі дослідження.

1. Вивчити цитотоксичну активність та визначити оптимальні режими застосування червоного та інфрачервоного лазерного випромінювання на чутливі і резистентні до доксорубіцину клітини ліній MCF-7 та MCF-7/Dox.
2. Дослідити модифікуючий вплив червоного та інфрачервоного лазерного випромінювання на цитотоксичну активність доксорубіцину у клітинних лініях MCF-7 та MCF-7/Dox.
3. Проаналізувати цитоморфологічні особливості клітин ліній MCF-7 та MCF-7/Dox внаслідок дії доксорубіцину за умов приєднання лазерного випромінювання.
4. Охарактеризувати зміни клітинного циклу та білків, що беруть участь в його регуляції, у чутливих та резистентних клітинах ліній MCF-7 та MCF-7/Dox під впливом лазерного випромінювання та доксорубіцину.
5. З'ясувати особливості експресії білків-регуляторів апоптозу у чутливих та резистентних клітинах раку молочної залози після дії лазерів та доксорубіцину
6. Обґрунтувати перспективи використання лазерного випромінювання для підвищення цитотоксичної активності доксорубіцину та подолання медикаментозної резистентності.

Об'єкт дослідження – клітинні лінії аденокарциноми молочної залози людини MCF-7 - чутлива до доксорубіцину та MCF-7/Dox - резистентна до доксорубіцину.

Предмет дослідження – підвищення цитотоксичної активності доксорубіцину та подолання медикаментозної резистентності шляхом застосування лазерного випромінювання.

Методи дослідження.

Чутливість клітинних ліній до доксорубіцину досліджували за допомогою МТТ-тесту. Морфологічні дослідження клітин РМЗ проводили після фарбування цитологічних препаратів клітин лінії MCF-7 та MCF-7/Dox за Романовським-Гімза. Дослідження особливостей експресії білків-регуляторів апоптозу проводили із застосуванням імуноцитохімічної реакції. Вивчення вмісту ДНК та аналіз клітинного циклу ліній здійснювали методом проточної цитометрії на проточному цитофлуориметрі Beckman Coulter EPICS® XL (США). Статистичний аналіз результатів проводили з використанням пакету програмного забезпечення Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США).

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше в експериментальних системах *in vitro* доведена можливість використання лазерного опромінення низької енергії з довжиною хвилі 660 та 810 нм як модифікуючого фактора, який підвищує протипухлинну ефективність доксорубіцину по відношенню до чутливих і резистентних клітин РМЗ людини.

Доповнені наукові відомості щодо цитоморфологічних змін пухлинних клітин культур MCF-7 та MCF-7/Dox, які відбуваються внаслідок поєднаного впливу доксорубіцину і лазерного опромінення: описано розрив суцільного шару наростаючих клітин з утворенням ніш, появу гігантських клітин з деформованими ядрами. Вперше доведено можливість підвищення ефективності протипухлинної дії доксорубіцину за умов приєднання інфрачервоного лазерного світла при певних умовах опромінення: термін дії лазера 7 та 10 хвилин, доза опромінення 15 Дж/см², щільність потужності 50мВ/см².

Вперше проаналізовано про-апоптотичні та антипроліферативні ефекти доксорубіцину в залежності від поєднання з впливом лазерної фотобіомодуляції різної довжини хвилі. Вперше з'ясовано значимість подолання апоптотичного порогу у клітинних лініях MCF-7 та MCF-7/Dox, яке залежить від сукупності про-апоптотичних ефектів доксорубіцину і лазерного випромінювання: зростання експресії p53 та Bax, зниження експресії Bcl-2. Поєднаний вплив інфрачервоного лазерного випромінювання і доксорубіцину у відносно малій

концентрації 0,5 мкг/мл призводить до підвищення експресії Bax та p53 до рівня $70,1 \pm 3,6$ балів H-Score та $77,2 \pm 5,2$ балів H-Score, відповідно, що вдвічі перевищує показники в групі контролю. Вперше вивчено особливості поєднаного впливу лазерного опромінення і доксорубіцину на розподіл клітин РМЗ людини за фазами клітинного циклу – доведена антипроліферативна ефективність запропонованої методики: зафіксовано найменшу кількість клітин у фазі G2/M (24,44%) на тлі високої частки клітин у фазі G0/G1 – 43,4% ($p < 0,05$).

Вперше запропоновано інтегровану схему механізмів про-апоптотичної дії інфрачервоного лазера та доксорубіцину, які діють у синергії, що надає перспективи для подолання резистентності пухлинних клітин до доксорубіцину і підвищення його протипухлинної ефективності.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримані фундаментальні дані розширюють існуючі уявлення про механізми змін функціональної активності клітин ліній MCF-7 та MCF-7/Dox внаслідок дії доксорубіцину у поєднанні з модифікуючим впливом лазерного випромінювання.

Результати роботи експериментально обґрунтовують доцільність поєднання цитотоксичної дії доксорубіцину з модулюючим впливом лазерного опромінення визначених параметрів для збільшення протипухлинної ефективності хіміопрепарату по відношенню до клітинних ліній РМЗ людини MCF-7 та MCF-7/Dox.

У дисертаційній роботі вперше аргументовано застосування інфрачервоного лазерного випромінювання для подолання клітинами РМЗ людини апоптотичного порогу, що характеризується підвищенням експресії про-апоптотичних регуляторів (p53, BAX) і зниженням анти-апоптотичних (Bcl-2) і як наслідок – підвищення протипухлинної ефективності доксорубіцину.

Виявлена можливість ефективно поєднувати дію доксорубіцину та лазерного випромінювання дозволяє розглядати запропоновану методику як

започаткування перспективного наукового-практичного напрямку, що стане основою для стратегії підвищення ефективності хіміотерапії.

Результати проведеного дослідження можуть бути впроваджені в навчальний процес ВНЗ України у лекціях студентам та аспірантам, присвячених сучасним досягненням у лікуванні злоякісних новоутворень.

Особистий внесок здобувача.

Всі дослідження виконувались за безпосередньої участі здобувача. Більшість представлених експериментів, а також обробку і аналіз отриманих результатів виконано особисто здобувачем. Дисертаційна робота є закінченим дослідженням, основна частина якого виконана безпосередньо автором. Мета та дизайн дослідження розроблені у співпраці з науковим керівником. Здобувачем особисто проведено інформаційний пошук та аналіз наукової літератури з питань, які були об'єктом і предметом дослідження. Здобувач самостійно провів аналіз одержаних результатів та здійснив їх статистичну обробку. Дисертант брав безпосередню участь у підготовці наукових публікацій до друку. Спільно з науковим керівником сформульовано основні положення та висновки дисертації. У роботах, написаних у співавторстві реалізовані наукові ідеї здобувача.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені та обговорені на: XIV з'їзді онкологів та радіологів України (Київ, 2021), конференції «All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology» (Київ, 2022), IX Міжнародному конгресі «Інноваційні технології в гінекології, мамології та естетичній медицині» (Київ, 2022), VIII Міжнародному конгресі «Інноваційні технології в гінекології, мамології та естетичній медицині» (Київ, 2022), шостій всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, 2022) та Conference "International scientific integration '2022" (Сієтл, США).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових праць, зокрема 8 статей, серед яких 2 статі у журналах, що належать до фахових видань із переліку затверджених МОН України, 3 публікації у

виданні, що індексується наукометричною базою Web of Science, 4 тез у збірках наукових конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 141 сторінці комп'ютерного набору. Робота містить наступні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати власних досліджень, узагальнення та обговорення результатів, висновки та список використаної літератури, який налічує 181 посилання. Робота проілюстрована 33 рисунками та 24 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Передумови застосування лазерного випромінювання для підвищення ефективності конвенціональної протипухлинної терапії.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) [1], рак є основною причиною смерті в усьому світі, на нього припадало майже 10 мільйонів смертей у 2020 році. Найпоширенішим різновидом раку за кількістю нових випадків був рак молочної залози (РМЗ) – 2,26 млн випадків [1], тому, вочевидь, РМЗ є найактуальнішою медико-соціальною проблемою. В даний час з'ясовано молекулярно-генетичну природу злякисного росту та значення спадкових факторів у схильності до розвитку РМЗ, продовжуються клінічні та експериментальні дослідження з метою ідентифікації біології пухлинної клітини для підвищення ефективності лікування цього захворювання [1,2].

Висока гетерогенність гістологічних типів та молекулярних підтипів РМЗ, заснована на клініко-морфологічних, молекулярно-генетичних, епідеміологічних та інших підходах, а також суттєві відмінності у факторах ризику дозволяють говорити, що питання вибору тактики лікування хворих на РМЗ остаточно не вирішено. Тим не менш, сучасний рівень знань про молекулярні механізми виникнення і розвитку РМЗ, його чутливості та/або резистентності до різних препаратів і впливів дозволяє розробляти перехід від усереднених стандартних схем терапії до призначення лікування відповідно до індивідуальних особливостей кожної пацієнтки з урахуванням біологічних характеристик пухлини [3,4]. Слід також зауважити, що одним з основних завдань розробки нових підходів до лікування в онкології є зниження токсичності для тканин, не уражених пухлиною при збереженні ефективності лікування пухлинного пласту.

На шляху вдосконалення лікувальних методик в онкології одну з вирішальних ролей відіграє прогрес сучасної лазерної медицини, що призвів до появи принципово нових технологій, які крок за кроком впроваджуються у клінічну практику. Нині все більшого поширення знаходять нові методи лікування, засновані на досягненнях фотохімії, фотобіології та квантової

фізики. Ефективність лікування пухлин з використанням лазерних технологій підтверджена у багатьох доклінічних та клінічних дослідженнях [5-9]. Вивчення впливу лазерів на біологічні об'єкти, зокрема, і в рамках удосконалення терапевтичних підходів до лікування онкологічних хворих, продовжує залишатися в фокусі уваги дослідників по всьому світу [10-12]. Біологічна різноманітність злоякісних новоутворень надає дослідникам майже необмежений потенціал для реалізації різних науково-обґрунтованих стратегій, в тому числі з використанням поєданого впливу на пухлинні клітини енергії світла і хіміотерапевтичних агентів. Здатність енергії світла при різних параметрах опромінення або сприяти регенерації клітин, або ініціювати в них виникнення патологічних змін внаслідок модуляції метаболічних процесів на сьогодні є пріоритетним напрямком фундаментальних та клінічних досліджень [13,14].

Лазерне випромінювання може бути самостійним напрямком у лікуванні пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями із застосуванням таких методів, як лазерна термодеструкція, фотодинамічна терапія (ФДТ), а також поєднуватися з іншими загальноновизнаними методами лікування з метою підсилення їх ефективності [15-17]. Зокрема, низькоінтенсивне лазерне випромінювання при використанні методу фотобіомодуляції (ФБМ) може сприяти підвищенню накопичення в малігнізованих тканинах цитостатичних препаратів та підсилювати їх токсичну дію. Фотобіомодуляційна терапія (ФБМТ) – метод, заснований на застосуванні світла з метою впливу на експресію або активність фоторецепторів ендогенних ферментів, ініціювання сигнальних шляхів, які модулюють клітинний та тканинний метаболізм, проліферацію клітин та запальну реакцію [18]. ФБМТ знайшла широке використання в медицині для відновлення тканин, регенерації м'язів, зменшення вираженості болю під час лікування ран, зниження проявів запалення. Джерелом світла зазвичай є лазери малої потужності (500 мВт) або світлодіоди в червоній та ближній інфрачервоній (ІЧ) ділянці спектру (600–850 нм), що забезпечує ефективне проникнення світла, відсутність канцерогенних чи мутагенних ефектів та мінімальний тепловий вплив [19,20]. У механізмах дії ФБМ провідну роль

відіграють активні форми кисню (АФК), які у невеликих кількостях виступають посередниками та ініціюють каскад клітинних процесів. Іншими молекулами, які задіяні у механізмах ФБМ, є аденозинтрифосфат, Ca^{2+} та NO. Зміни редокс-потенціалу, викликані впливом ФБМ, активують редокс-чутливі фактори транскрипції, що призводить до проліферації фібробластів, синтезу колагену, модуляції запалення та антиоксидантних реакцій, посилення ангиогенезу, оксигенації та відновлення тканин.

Викликає інтерес той факт, що ФБМ з використанням червоного лазерного опромінення може реалізувати фототоксичні ефекти без генотоксичного чи мутагенного впливу, сприяючи загибелі злякано трансформованих клітин шляхом аутофагії та апоптозу завдяки збільшенню активності АФК та ініціації експресії ATL-4 і HSP70. Існують також повідомлення про те, що опромінення червоним лазером з довжиною хвилі 632 нм призводить до регресії експериментальних пухлини молочної залози ЕМТ6 у мишей [21,22].

При використанні червоного лазерного світла із довжиною хвилі 660 нм на культуру плоскоклітинного раку ротової порожнини було зафіксовано значне зниження їх проліферативної активності та відсотка клітин у G1-фазі, а також значне збільшення кількості клітин у S-фазі порівняно з контролем. Зазначені ефекти супроводжувались зростанням кількості апоптотичних клітин [23].

Дослідники вивчили вплив різних протоколів ФБМ на моделях канцероген-індукованих пухлин ротової порожнини у мишей з використанням макроскопічного, гістологічного та цитометричного аналізу. Виявлено гальмування росту новоутворень, обумовлене секрецією інтерферонів I типу Т-лімфоцитами та дендритними клітинами. Крім того, зафіксовано зменшення кількості ангиогенних макрофагів у пухлинному вогнищі [24].

Нещодавно було повідомлено про результати застосування лазерного опромінення низької енергії, яке пригнічувало проліферацію пухлинних клітин, посилювало апоптоз, гальмувало міграцію та інвазію клітин. Виявлено, що зазначені ефекти дії лазерного опромінення призводять до пошкодження ДНК

клітин досліджених ліній за рахунок накопичення АФК та активації p53. Крім того встановлено, що фотобіомодуляція сприяє загибелі клітин остеосаркоми людини шляхом аутофагії [25,26].

На початку 2023 року вперше опубліковано результати вивчення ефективності поєднаного застосування лазерів низької енергії (ЛНЕ) та імунотерапії [27]. В експериментах *in vitro* та *in vivo* встановлено, що використання лазерного із довжиною хвилі 650 нм опромінення дозволяє суттєво підвищити ефективність сапорин-кон'югованого цетуксимабу по відношенню до клітин A431, A549 та MCF7.

Згідно даних деяких клінічних спостережень [28] застосування ФБМ дійсно дозволяє не лише покращити результати лікування хворих на рак, але й підвищити показники їх виживаності. Так, дев'яносто чотири пацієнти з діагнозом рак ротоглотки, носоглотки та гіпофаринкса отримували променеву терапію плюс цисплатин кожні три тижні. ФБМ застосовували на дев'ять точок слизової оболонки порожнини рота щодня, впродовж п'яти днів; параметри опромінення становили 660 нм, 100 мВт, 4 Дж/см² [28]. Протягом періоду спостереження тривалістю 41 місяць пацієнти, які отримували ФБМ, мали статистично значущу кращу повну відповідь на лікування, ніж пацієнти в групі плацебо ($p = 0,013$). Пацієнти, яким проводили ФБМ, мали кращу безрецидивну виживаність, ніж пацієнти в групі плацебо ($p = 0,030$), і мали тенденцію до підвищення показників загальної виживаності. Таким чином, застосування ФБМ дозволило не лише уникнути мукозиту ротової порожнини, але й забезпечило повноцінне виконання протоколу хіміопроменевої терапії.

Окремим напрямом застосування лазерів низької енергії в онкології є профілактика та лікування розповсюджених ускладнень, які виникають внаслідок використання конвенціональних методик терапії раку. Зокрема, ФБМ продемонструвала високу ефективність у лікуванні орального мукозиту, дисфункцій слинних залоз, фіброзу слизових оболонок, радіодерматиту, периферичної нейропатії та ін. Визначні успіхи в цьому напрямі призвели до оприлюднення у 2022 році клінічних протоколів застосування ФБМ для профілактики та лікування ускладнень хіміотерапії та променевої терапії, які

були створені групою експертів WALT (World Association for Laser Therapy) [29].

Однак слід зазначити, що на сьогодні поки що не розроблено алгоритмів застосування лазерного опромінення низької енергії в якості протипухлинного фактора – як самотійно, так і у поєднанні з іншими чинниками, тому дослідження в цьому напрямі продовжуються [30]. Більш того, залишається нерозкритим можливий потенціал застосування ФБМ для підсилення ефективності або покращення переносимості хіміотерапії. Перші позитивні результати використання низькоінтенсивного лазерного опромінення з визначеною дозою, часом опромінення і щільністю потужності з урахуванням гістогенезу пухлин та ступеня їх злоякісності в поєднанні із хіміотерапією дозволяють сподіватися у осяжному майбутньому на прогнозовано кращі результати лікування онкологічних захворювань.

1.2 Сучасні уявлення про механізми впливу лазерного опромінення на нормальні та злоякісно трансформовані клітини

На сьогоднішній день відомо, що біологічні ефекти лазерів, в тому числі, інфрачервоного світлового опромінення залежать від молекули фотоакцептора. Провідна гіпотеза, яка пояснює, як саме світло підвищує активність ферменту цитохром С оксидази (ЦСО), полягає в тому, що оксид азоту (молекула, яка, як відомо, інгібує ЦСО шляхом нековалентного зв'язування між гемом-а3 і CuV), може бути фотодисоційований шляхом поглинання фотонів інфрачервоного світла. Одна з теорій дає роз'яснення, чому фотобіомодуляція має більший вплив на патологічні клітини та тканини, і практично не викликає пошкодження немалігнізованих клітин – полягає в тому, що вони, швидше за все, мають інгібуючу концентрацію NO [31,32].

Результати низки досліджень свідчать на користь того, що саме модуляція окисно-відновних процесів у клітинах в результаті застосування лазерного опромінення призводить до суттєвих метаболічних змін та різних сценаріїв біологічної поведінки. При дослідженні механізму дії лазерів низької енергії (ЛНЕ) фіксували збільшення продукції активних форм кисню (АФК) у

фібробласти шкіри [33]. Також виявлено тимчасове збільшення потенціалу мітохондріальної мембрани та внутрішньоклітинного кальцію разом із збільшенням продукції АФК і стимуляцією цитоплазматичного підлужнення, що демонструє численні аспекти мітохондріальних змін, спричинених ЛНЕ [34]. Дослідження також показали, що ЛНЕ (810 нм) індукує продукцію АФК та АТФ за рахунок активації NF-κB у мишачих ембріональних фібробластих [35].

Теорія механізму дії фотобіомодуляції на клітини стверджує, що фотонне випромінювання прямо або опосередковано спрямоване на ДНК і пул геному. Вільні радикали (включаючи АФК) утворюються під впливом низькоінтенсивного лазерного випромінювання. Відомо, що високі рівні АФК є токсичними, що призводить до переривання численних сигнальних каскадів. Навіть у низьких рівнях АФК можуть індукувати апоптоз у клітинах раку молочної залози MCF-4 і преостеобластичних клітинах MC3T3, діючи як вторинні посередники різних сигнальних шляхів [36,37]. У окремих дослідженнях повідомляється про вплив світла низької інтенсивності при 650, 808 та 1064 нм на нейрони та два типи ракових клітин (нейробластома та HeLa), зосереджено на фотоіндукованій зміні внутрішньоклітинного рівня іонів Ca^{2+} та відповідних сигнальних шляхів. Отримані результати показують, що світло 650 та 808 нм сприяє внутрішньоклітинному підвищенню Ca^{2+} незалежно від гістогенетичного походження клітини, але з різною динамікою через особливості регуляції Ca^{2+} в нейронах та ракових клітинах. Визначено дві причини, що відповідають за підвищення Ca^{2+} : приплив екзогенних іонів Ca^{2+} в клітини та вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума. Вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума, активованого утворенням активних форм кисню, розглядається як можливий світлозалежний сигнальний шлях [38,39]. Поряд з цим, встановлено, що наслідки дії лазерного світла проявляються перш за все у функціонуванні найбільш вразливих для опромінення структур в клітині – мембран мітохондрій [39,40]. Вплив на мітохондрії викликає збільшення продукції активних форм кисню, що у нормальній ушкодженій клітині може послужити передумовою для більш активної діяльності та покращення здатності до відновлення [41,42]. Натомість

у злоякісно трансформованих клітинах, у яких синтез АФК може бути початково більш інтенсивним, через вплив лазера виникає ризик утворення патологічного кола – внаслідок стимулювання АФК-індукованої додаткової продукції АФК [43-45].

Коли ми розглядаємо можливість того, що ФБМ може мати протипухлинну ефективність, важливо усвідомлювати, що натеper вивчено два основні механізми, за допомогою яких це може статися. Перший передбачає прямий вплив світла на самі пухлинні клітини, і його можна розглядати як навмисне використання двофазної кривої «доза-реакція» для «перевантаження» ракових клітин. Цю методологію підтвердила лабораторія Да Сіна в Китаї. Дослідники називають цей підхід «високофлюенсне лазерне опромінення малої потужності, HF-LPLI», при опроміненні використовується HeNe-лазер з довжиною хвилі 632 нм [46,47].

Інший механізм ґрунтується на використанні диференціального ефекту ФБМ між злоякісними клітинами порівняно з ефектами, які спостерігаються на здорових нормальних клітинах. Це передбачає поєднання ФБМ з додатковою цитотоксичною протипухлинною терапією, щоб збільшити знищення ракових клітин, водночас захищаючи нормальні здорові клітини. Ці міркування пов'язані з ефектом Варбурга, за допомогою якого мітохондрії ракових клітин змінюють свій метаболізм, щоб здійснювати аеробний гліколіз замість окисного фосфорилування [48]. Це явище відбувається внаслідок швидкого росту пухлинних клітин, що випереджає розвиток достатнього кровопостачання, змушуючи ракові клітини стати толерантними до хронічної гіпоксії. При гліколізі споживається набагато менше кисню, ніж при окисному фосфорилуванні. Наслідки ефекту Варбурга полягають у тому, що злоякісні та нормальні клітини можуть дуже по-різному поводитися у відповідь на ФБМ. У ракових клітинах, де надходження аденозинтрифосфату (АТФ) є досить обмеженим, посилення синтезу АТФ, що забезпечується ФБМ, може дозволити раковим клітинам реагувати на проапоптотичні цитотоксичні стимули з більш ефективним виконанням програм загибелі клітин, які сильно залежать від енергії, тобто вимагають багато АТФ [49]. І навпаки, у нормальних здорових

клітинах, які мають достатній запас АТФ, ефект ФБМ хоча і викликає сплеск утворення АФК, цього виявляється не достатньо для запуску про-апоптотичної програми у клітині (рис.1.1).

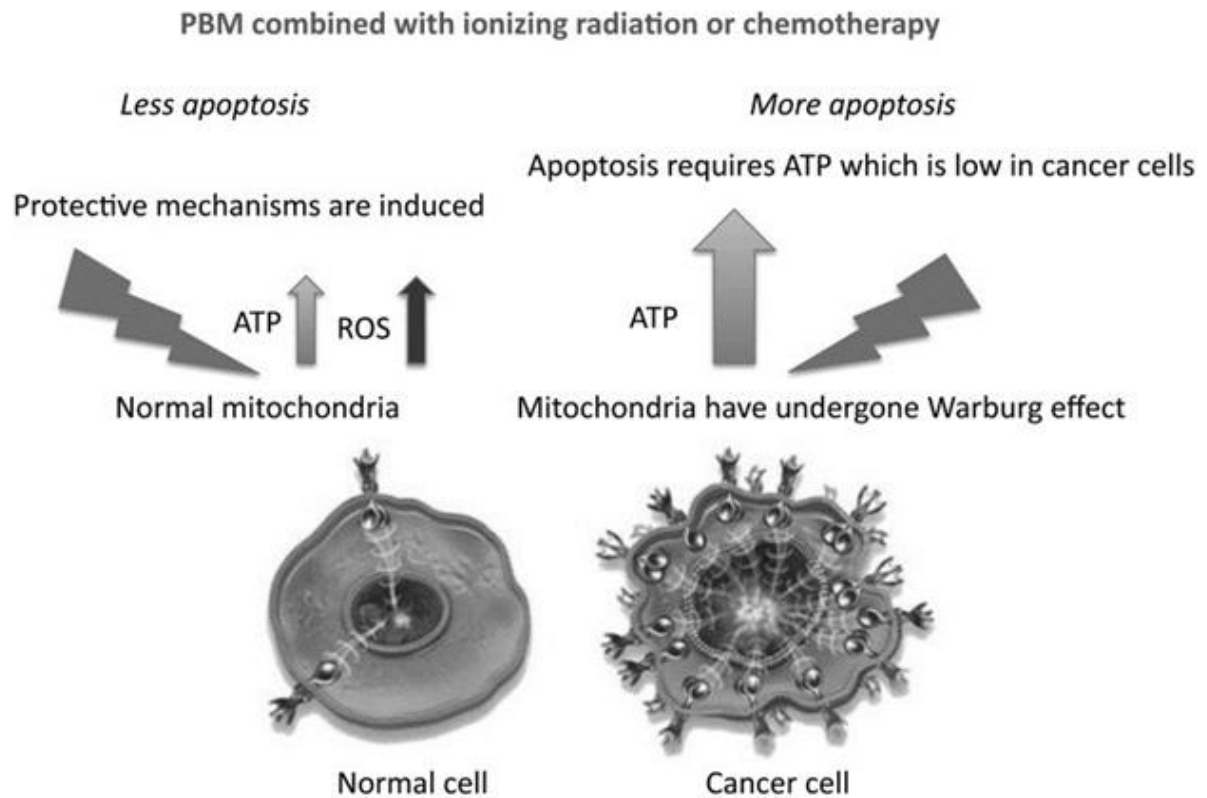


Рис.1.1 Наслідки впливу ФБМ на нормальні та злоякісно трансформовані клітини [50].

У дослідженнях повідомляється, що внаслідок зазначених ефектів ФБМ злоякісно трансформовані клітини гинуть шляхом запрограмованої смерті, в той час як по відношенню до немалігнізованих клітинах ФБМ володіє цитопротекторною дією. Тобто, лазерне опромінення низької енергії можна розглядати як багатообіцяючий додатковий фактор впливу для підвищення ефектів протипухлинної терапії із одночасною відсутністю шкідливої дії на здорові тканини [51,52].

Слід також зауважити, що у порівнянні з нормальними клітинами, у яких мітохондріальні окислювально-відновні процеси, зокрема регуляція синтезу АФК, знаходяться у динамічній рівновазі, в ушкоджених клітинах (при

запаленні та/або гіпоксії) відбувається порушення регуляції кисневого метаболізму, зниження репаративного потенціалу. У атипових клітинах через підвищену метаболічну активність відбувається надлишковий синтез АФК. При лазерному впливі на таку клітину на тлі базово підвищеного синтезу АФК відбувається модуляція цього процесу, що призводить до так званого АФК-індукованого вивільнення АФК [53-55] (рис.1.2.).

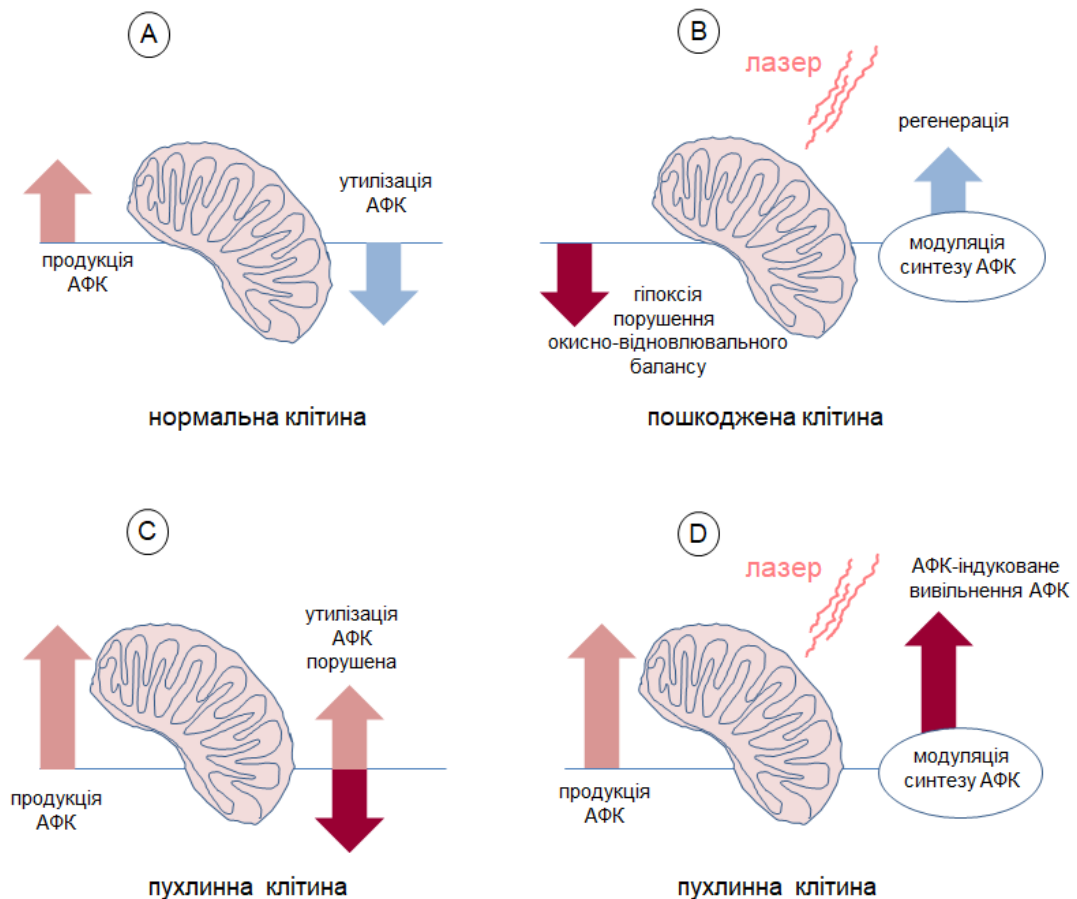


Рис.1.2. Схематичне зображення механізмів дії лазерного опромінення

Оскільки пухлина – це структурно неоднорідна і функціонально нестабільна система, у якій присутні та взаємодіють між собою різні клітинні популяції, представляється обґрунтованим вивчення дії лазерів не тільки на пухлинні, але й на імунокомпетентні клітини.

Дослідження *in vitro* продемонстрували, що ФБМ з використанням різних доз опромінення індукує продукування цитокінів у клітинах периферичної

крові, а також сприяє значному підвищенню як фагоцитарної, так і хемотаксичної активності лейкоцитів [56-58]. Існують також повідомлення про те, що лазерне опромінення може впливати на біологічні функції макрофагів [59,60]. Застосування фотобіомодуляції визнано перспективним для впливу як на запальний так і на протизапальний профілі макрофагів [61]. Тому вивчення імуномодуючої дії лазерного випромінювання на активність пухлинно-асоційованих макрофагів може бути актуальним етапом на шляху пошуку нових способів підвищення ефективності лікування злоякісних новоутворень.

Резюмуючи цю частину огляду літератури про стан проблеми, можна зробити висновок, що лазерне опромінення має значний потенціал застосування в онкології: і як самостійний фактор впливу, і як ад'ювант конвенціональних методик терапії, а також може розглядатися як лікувальний чинник, що здатний індукувати апоптоз злоякісних клітин, не впливаючи на пул нормальних клітин.

1.3.Вплив лазерного опромінення на ефективність протипухлинних препаратів

Відомо, що вплив лазерного опромінення на цитостатики залежить від їх фізико-хімічних особливостей, але має спільні закономірності. Після дії лазерів з різними показниками довжини хвилі протипухлинні препарати реагують у двофазний спосіб – спочатку відбувається поглинання фотонів, а потім – емісія; також важливим є те, що ці явища відбуваються не послідовно, а мають певний період перекриття: спочатку відбувається згасання поглинання, яке чередується з випромінюванням, що наростає [62]. З'ясовано, що спектри поглинання-випромінювання та відповідна площа їх перекриття (overlap) є різними для таких препаратів як доксорубіцин, паклітаксел та блеоміцин. Виявлено, що при вищих концентраціях доксорубіцину зменшення площі перекриття утримується від подальшого зсуву у бік червоного спектру; і навпаки, паклітаксел зазнає дедалі більшого червоного зсуву вправо в порівнянні з доксорубіцином. Зазначені ефекти пов'язані з природою широкої області перекриття паклітакселу, що тягнеться від 200 до 1100 нм. Аналогічні характеристики

демонструє блеоміцин, але зі значно меншою площею перекриття поглинання-випромінювання [62].

У дослідженнях встановлено, що активація за допомогою енергії світла сприяє підвищенню протипухлинної ефективності циклофосфаміду, 5-фторурацилу та цисплатину [63-65]. Посилення протипухлинної дії цитостатиків відбувається за допомогою багатьох механізмів, у тому числі за рахунок ураження ДНК, що зрештою призводить до апоптозу [65-67]. У більшості досліджень мова йде переважно про підвищення цитотоксичності за рахунок поєднання з різноманітними транспортними системами та іншими хімічними сполуками, коли енергія світла відіграє роль каталізатора вивільнення цитостатика із наночастинок або ліпосом, а також фактора підвищення температури пухлин [68-70].

Окремо слід зупинитися на структурі, механізмах дії та фотореактивних властивостях найбільш розповсюдженого протипухлинного антибіотика – доксорубіцину, що використовується для лікування багатьох типів раку [71,72]. Висока цитотоксична активність доксорубіцину по відношенню до злоякісно трансформованих клітин, які швидко діляться, а також ефективність його використання для уповільнення прогресування захворювання була широко визнана протягом кількох десятиліть і обмежена лише його високою токсичністю щодо органів і тканин, не уражених пухлиною [73-75].

Доксорубіцин є полярною молекулою з високою делокалізацією заряду та ефективним акцептором електронів, а наявність аліфатичного бічного ланцюга у його структурі відіграє важливу роль у зв'язуванні зі спіраллю ДНК [76-78].

Як і інші антрацикліни, доксорубіцин взаємодіє з ДНК шляхом інтеркаляції – механізму, який призводить до порушення відновлення ДНК, що відбувається за допомогою топоізомерази II [79,80]. Доксорубіцин інгібує топоізомеразу II, яка перекручує ДНК під час транскрипції, тим самим запобігаючи рекомбінації подвійного ланцюга ДНК зупиняючи таким чином реплікацію. Додаткова пошкоджуюча дія доксорубіцину полягає в утворенні вільних радикалів, які, у свою чергу, можуть пошкодити ДНК і призвести до загибелі клітини [81,82].

Зв'язуючись з декількома молекулярними мішенями, такими як ферменти топоізомерази I та II, доксорубіцин викликає ряд цитотоксичних ефектів у поєднанні з пригніченням проліферації що призводить до пошкодження ДНК [83]. Шлях апоптозу запускається у випадку неможливості відновлення розривів ДНК, що спричиняє пригнічення пухлинного росту за рахунок інгібування в G1 та G2 фазах клітинного циклу. Також відомо, що взаємодія доксорубіцину з ДНК може викликати припинення реплікації ДНК і транскрипції РНК [84,85].

Цей процес відбувається, коли доксорубіцин проникає в клітину шляхом дифузії, завдяки своїй афінності для зв'язування з протеасомами цитоплазми. Протеасомний комплекс доксорубіцину утворюється, коли доксорубіцин зв'язується із субодиницею 20S протеасоми, звідки він потім переміщається через ядерні мікропори у ядро. Доксорубіцин також провокує утворення високореакційних видів гідроксильних вільних радикалів, які викликають токсикологічні ефекти [86,87].

Ефективність використання доксорубіцину по відношенню до злоякісно трансформованих клітин на сьогодні остаточно доведена, а механізми дії цього цитостатику протягом багатьох років досліджувались по відношенню до клітин різного гістогенезу. Встановлено, що доксорубіцин відіграє роль у таких клітинних процесах як метаболізм церамідів і клітинний цикл [88].

Завдяки своїй молекулярній структурі доксорубіцин є хромофором, здатним поглинати світло в широкому діапазоні видимого спектру, що свідчить про перспективи його використання в якості потенційного фотосенсибілізатора (ФС). На відміну від попередніх досліджень, у яких вивчали ефективність ХТ на основі доксорубіцину в поєднанні з ФС, сучасні роботи розкривають потенціал його фотосенсибілізуючих властивостей. Встановлено, що після фотоактивації доксорубіцину у пухлинному вогнищі спостерігається світлозалежне утворення АФК, що сприяє підвищенню його цитотоксичної активності [89,90].

У дослідженні, оприлюдненому у 2023 році [91], показана здатність доксорубіцину поглинати фотони і переходити з основного стану (S₀) у перший

синглетний збуджений стан (S_1). При цьому процес фотоактивації характеризується вже описаним вище принципом двофазності, але має важливу рису – при збереженні довжини хвилі на рівні 350 – 482 нм, в той час як після збудження молекула доксорубіцину може повернутися із активованого стану у стабільний.

Натомість при збільшенні $\lambda > 487,7$ нм доксорубіцин невідворотно починає відігравати роль фотосенсибілізатора – завдяки проходженню інтерсинглетного циклу (ISC) із стану S_1 у стан T_1 із формуванням двох таутомерів: відносно стабільного і менш фотоактивного НОМО та нестабільного і більш фотоактивного LUMO. Саме у молекулярному стані T_1 доксорубіцин ініціює утворення у клітинах синглетного кисню та запускає каскад утворення АФК.

Слід додати, що активація основного метаболіту доксорубіцину – доксорубіцинолу починається саме на рівні піку поглинання енергії світла із довжиною хвилі 450 – 480 нм. Можна припустити, що збільшення довжини хвилі і, відповідно, вплив інфрачервоного випромінювання викликає зсув поглинання доксорубіцином енергії світла і як наслідок – уповільнення активації доксорубіцину та зростання терміну експозиції його основного метаболіту доксорубіцинолу, який володіє пролонгованою цитотоксичною дією [62,92,93].

В свою чергу, утворення в клітинах доксорубіцинолу та його метаболізація у мітохондріях може викликати порушення дихання та призводити до вивільнення цитохрому-С, що ініціює апоптоз [94-96]. У цьому контексті обґрунтованою представляється перспектива поєднання впливу лазера та цитостатиків на пухлинні клітини з метою підвищення ефективності ХТ [97,98]. Апоптоз, викликаний АФК-індукованою продукцією АФК може бути прогнозованим явищем, тому що це еволюційно запрограмований сценарій у випадку, якщо метаболічні зміни стають несумісними з нормальним функціонуванням клітини [99-101].

Доксорубіцин як цитотоксичний чинник при впливі на неушкоджену клітину провокує надмірне вивільнення АФК, однак вмикаються компенсаторні

антиоксидантні механізми і клітина переживає стрес. Підвищене продукування АФК відбувається і внаслідок впливу доксорубіцину на злоякісну клітину, яка відрізняється метаболічною нестабільністю, та неспроможністю компенсаторних механізмів нівелювання оксидативного стресу. Пошкодження ДНК після дії доксорубіцину викликає активацію комплекс-1-залежний каскад утворення АФК за участю p53, що може сприяти зростанню активності системи каспаз та апоптозу [102-105].

Отже, результати досліджень свідчать, що фотоактивація доксорубіцину викликає генерацію пероксидів та синглетного кисню (1O_2) і призводить до підвищення його цитотоксичної активності. Енергія лазера приєднується до первинної здатності доксорубіцину локалізуватися в структурах ядра, і після фотоактивації молекули DOX можуть створити умови для запуску апоптотичної програми.

Таким чином, застосування лазерного опромінення у поєднанні з хіміотерапевтичними агентами – це новий перспективний напрям для фундаментальних і клінічних досліджень з метою розробки обґрунтованих стратегій протипухлинної терапії.

1.4. Перспективи застосування лазерного опромінення для оптимізації медикаментозного лікування хворих на рак

Відомо, що лазерна технологія здатна неінвазивно і точно доставляти енергію до біологічних систем у заздалегідь визначених просторово-часових координатах і, таким чином, природно підходить для терапевтичного впливу на пухлинні клітини завдяки реалізації ефектів фотобіомодуляції (ФБМ) [106,107].

Досягнення сучасної лазерної медицини демонструють доцільність застосування ФБМ для підвищення протипухлинної дії інших методів лікування не лише з метою більш ефективного знищення злоякісно трансформованих клітин, але й для забезпечення мінімізації пошкодження тканин, неушкоджених пухлиною [108-110].

Лазерне опромінення створює окислювальний стрес і модулює у клітинах метаболічні процеси відповідно в інфрачервоному, видимому та

ультрафіолетовому діапазонах [111,112]. Фотобіомодуляція по своїй суті є феноменом нетеплової та нетоксичної дії на біологічні об'єкти з використанням когерентного монохроматичного світла низької інтенсивності, що зазвичай відповідає видимому червоному (400–720 нм) та ближньому інфрачервоному (700–1000 нм) діапазону [113,114].

Встановлено, що сильно сфокусований лазер може викликати внутрішньоклітинне вивільнення Ca^{2+} у клітинах різного гістогенезу. Кальцій (Ca^{2+}) відіграє важливу роль у багатьох ключових клітинних процесах як універсальний вторинний месенджер, який регулює старіння через ядерний фактор активованих Т-клітин (NFAT) та NF- κB [115,116]. Таким чином, можна впливати на клітинне старіння за допомогою лазерно-регульованої передачі сигналу Ca^{2+} [117-130].

Реалізація впливу ФБМ відбувається шляхом модуляції синтезу АТФ, оксиду азоту (NO), активних форм кисню (АФК) і транскрипції/експресії генів. Зазначене свідчить, що ФБМ можна потенційно розглядати як один з нових способів лікування злоякісних новоутворень, в тому числі раку молочної залози [131,132].

Відомо, що після винаходу лазера він використовувався здебільшого для видалення новоутворень, загоєння ран і регенерації нервів, знеболення та лікування набряків і запалення протягом приблизно 40 років [133-135]. ФБМ реалізує новий підхід, при якому можлива модулююча дія на різні клітинні функції в залежності від довжини хвилі [137-140]. Встановлено, що лазерне опромінення низької енергії може не тільки викликати збільшення синтезу АТФ, генерації АФК і вивільнення NO, але й індукувати експресію ядерного фактору каппа В (NF- κB), який може впливати на транскрипцію інших генів [141,142].

Як відомо, ФБМ індукує деякі клітинні механізми, такі як проліферація, диференціювання та апоптоз, запускаючи клітинні шляхи та активацію мітохондріального дихального ланцюга. В залежності від довжини хвилі, ФБМ може модулювати синтез та вивільнення факторів росту, запальних цитокінів та інтерлейкінів через специфічні рецептори, які можуть по-різному сприймати

енергію лазера. В сучасних умовах медичне застосування ФБМ, зосереджене раніше на неінвазивному біостимулюючому ефекті, зазнає динамічної еволюції саме як біоінгібіторний фактор, спрямований на пригнічення розвитку патологічних процесів. Результати досліджень свідчать, що в залежності від параметрів опромінення та чутливості клітин до дії світла, біомодулюючі ефекти ФБМ варіюються від проліферації до запрограмованої смерті. Вважається, що біостимулюючий ефект пов'язаний із збільшенням продукування АТФ, а біоінгібіторний – з окислювальним стресом через перевантаження активними формами кисню (АФК) [143,144].

Потенціал негативного впливу фотобіомодуляції на ріст пухлин через фототоксичні реакції на сьогоднішній день докорінно не вивчений [145-150]. Деякі дослідження *in vitro* продемонстрували, що вплив лазера низької енергії може пригнічувати проліферацію злоякісних клітин: спостерігалось зниження швидкості мітозу в клітинних лініях остеосаркоми, раку шийки матки, гепатоми, гліобластоми, аденокарциноми молочної залози та легень [151,152].

Також слід ще раз зауважити, що ФБМ може не тільки створювати умови для ініціації каскаду реакцій апоптозу у пухлинних клітинах, але й модулювати активність макрофагів, що відкриває вікно можливостей для фотоімунотерапії злоякісних новоутворень [61]. Є також припущення, що лазер низької енергії здатен зменшувати цитотоксичні ефекти на нормальні клітини, при цьому підтримуючи руйнівну дію доксорубіцину на пухлинні клітини [153-155].

До причин лікарської резистентності найбільш розповсюдженого онкологічного захворювання XXI століття – РМЗ, належать соматичні мутації або епігенетичні зміни в межах клітин-мішеней, гетерогенність ракових клітин, ракові стовбурові клітини, асоційовані з раком макрофаги та модуляція імунних клітин, метаболічне перепрограмування та особливості взаємодій між раковими клітинами та пухлинним мікрооточенням [156,157].

Слід також зазначити, що у багатьох хворих спостерігається множинна лікарська резистентність, яка значно знижує ефективність хіміотерапії. Хіміотерапія провокує у пухлинних клітинах утворення та функціонування специфічної системи захисту проти цитостатиків - ефлюкських насосних систем,

а також здатна змінювати склад мікрооточення пухлини, що може потенційно обмежувати фармакокінетичні характеристики препаратів [158].

Дослідження продемонстрували, що окрему важливу роль у резистентності до протипухлинного лікування відіграють екзосоми – клітинні везикули діаметром 30-150 нм, які транспортують ДНК, РНК, ліпіди та білки в рамках процесів клітинної комунікації при розвитку пухлини [159].

Одним з показників, які характеризують здатність пухлинної тканини чинити опір цитостатичній терапії є рівень експресії остеопонтину. Остеопонтин (OPN) є членом сімейства інтегрин-зв'язуючих глікофосфопротеїнів, який надмірно експресується в кількох типах пухлин. Він бере участь у транспортуванні ліків, апоптозі, дозріванні стоволових клітин. Було показано, що рівні експресії OPN були суттєво пов'язані з ефективністю лікування засобами на основі платини у пацієнтів із прогресуючим недрібноклітинним раком легенів. Крім того, багатофакторний аналіз показав, що рівень експресії OPN може бути незалежним фактором для прогнозування відповіді пухлини на першу лінію хіміотерапії на основі платини. Високий сироватковий OPN перед лікуванням значно корелював із поганою відповіддю на хіміопроменеву терапію у пацієнтів з раком шийки матки. Крім того, проспективне дослідження в когорті метастатичного раку молочної залози продемонструвало, що рівні OPN у пацієнтів, резистентних до хіміотерапії, були значно вищими, ніж у пацієнтів, які реагували на хіміотерапію [160]. В свою чергу, інший пов'язаний з резистентністю білок-регулятор анексин-1 через інгібування процесів аутофагії продемонстрував своє значення у розвитку стійкості раку шлунку до хіміотерапії оксаліплатином [161,162].

Окрема роль мультирезистентності до хіміотерапії при РМЗ належить Р-глікопротеїну (або ABCB1/MDR1), який бере участь у відтоку речовин через клітинні мембрани і є частиною сімейства транспортерів. Цей білок може зв'язуватися з деякими хіміотерапевтичними препаратами, такими як антрацикліни, таксани та мітоксантрон, і виводити їх із внутрішньої частини клітини та вивільняти у позаклітинний простір. Відомо, що білок стійкості раку молочної залози (ABCG2/BCRP) транспортує 5-фторурацил, метотрексат,

доксوروبіцин, іринотекан, мітоксантрон та інші препарати за межі клітини, а також відповідає за резистентність клітин РМЗ до лікування доксوروبіцином [163-165]. Ще одним важливим механізмом розвитку резистентності пухлинних клітин до хіміотерапії є порушення каскаду загибелі мітохондрій. Мітофагія, або мітохондріальна селективна аутофагія, має вирішальне значення для контролю функціонування клітин, оскільки цей процес спрямований на знищення та утилізацію пошкоджених мітохондрій. Ракові клітини здатні використовувати мітофагію, щоб швидко знищити пошкоджені мітохондрії та створити умови для власної стійкості до ліків – і це в свою чергу знижує ефективність хіміотерапії. Проте, незважаючи на важливість мітохондрій і мітофагії в резистентності до хіміотерапії, мало відомо про її точні механізми. Є припущення, що під час хіміотерапевтичного стресу найбільш вразливими мікроструктурами у пухлинних клітинах є мембрани мітохондрій, де відбувається надмірний синтез та накопичення АФК, про що було згадано раніше. На розумінні вирішальної ролі мітохондрій у життєдіяльності клітин вибудовується логіка приєднання до цитостатика впливу фотобіомодуляції [166].

Саме забезпечення подолання резистентності пухлин до хіміотерапії може стати одним з основних завдань поєднаного застосування фотобіомодуляції і різних хіміотерапевтичних чинників. В останні 5 років вченими зроблені перші кроки на шляху вивчення потенціалу використання лазерного опромінення низької енергії як додаткового чинника для покращення ефективності лікування злоякісних новоутворень. Зокрема встановлено, що комбінація ФБМ з цисплатином викликає підвищення рівня цитохром С оксидази та провокує цитоморфологічні зміни у пухлинних клітинах [167]. Застосування лазера низької енергії у певних режимах призводить до апоптозу клітин раку підшлункової залози, створює умови для пригнічення проліферації пухлин кісток, покращує протипухлинну ефективність церетинібу в протоколах лікування немілкоклітинного раку легенів [168-170].

Також у контексті подолання резистентності і покращення ефективності протипухлинної терапії набувають актуальності можливі результати впливу

лазерного опромінення на мікрооточення пухлини, зокрема на лімфоцити та макрофаги, а також на імунні функції макроорганізму в цілому [171]. Адже незважаючи на появу сучасних імунотерапевтичних засобів, включно з інгібіторами імунних контрольних точок, які зробили революцію в лікуванні раку, лише незначна частка пацієнтів демонструє стійку відповідь. І саме фотобіомодуляція як додатковий чинник підвищення активності імунокомпетентних клітин може стати основою для нових підходів до подолання проблеми резистентності пухлин до терапії [172-174].

Резюмуючи огляд літератури, можна обґрунтовано припустити, що у найближчий осяжний час вивчення поєднаного впливу лазерного опромінення та хіміотерапії буде розвиватися як окремий експериментальний та клінічний напрям. Актуальність підвищення ефективності комбінованих схем лікування раку доповнюється нагальною потребою у продовженні пошуків нових підходів до подолання множинної резистентності злоякісних пухлин до хіміотерапії.

Потенціальна здатність лазерного опромінення з одного боку відігравати роль ад'ювантного фактора, який підвищує ефективність цитостатиків, а з іншого – модулювати метаболічні процеси в нормальних клітинах і сприяти підвищенню активності протипухлинного імунітету – відкриває перспективи для подолання хіміотерапевтичної резистентності раку і може створити умови для покращення результатів лікування онкологічних хворих.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика клітин ліній РМЗ та умови їх культивування

Для проведення експериментальних досліджень лінії клітин були отримані з клітинного банку ліній тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Дослідження проведено на 2-х клітинних лініях РМЗ людини: Клітини лінії MCF-7 – епітеліальні, адгезивні клітини аденокарциноми, отримані з раку молочної залози від метастатичного сайту із плевральної рідини. MCF-7/Dox – резистентна до доксорубіцину лінія клітин РМЗ, отримана співробітниками відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького з вихідної лінії клітин MCF-7 [181].

Клітини лінії MCF-7 та MCF-7/Dox культивували в повному поживному середовищі DMEM з 10% фетальною сироваткою теляти (ФСТ) і 40 мкг/мл гентаміцину в пластиковому посуді для культури клітин в зволоженій атмосфері при 5% CO₂ і 37⁰С. Зміну середовища і пересів клітин проводили за стандартною методикою. Клітини пересівали після досягнення ними 80-90% моношару із застосуванням розчину Версена. В експериментах використовували клітини, які перебували в експоненційній фазі росту.

2.2. Оцінка життєздатності клітин в системі *in vitro*

Підрахунок клітин ліній MCF-7 та MCF-7/Dox, що зазнали впливу доксорубіцину та різних режимів ФБМ проводили за допомогою гемоцитометра, фарбували клітини вітальним барвником – трипановим синім. Кількість клітин визначали за формулою: $A/80 \times 2 = X \cdot 10^6$ клітин в мілілітрі середовища, де А – кількість клітин, що була нарахована у камері Горяєва (в 5-ти квадратах), х2 – розведення з трипановим синім (1:1).

2.3. МТТ – тест

Цитотоксичну активність доксорубіцину та різних режимів ФБМ щодо клітин MCF-7 та MCF-7/Dox досліджували з використанням МТТ-тесту. В основу методу покладено здатність за допомогою мітохондріальних ферментів живої клітини перетворювати 3-[4,5 диметилтіазол-2-іл]-2,5 дифенілтетразоліум бромід – сіль жовтого кольору в кристалічний МТТ-формазап лілового кольору. Для цього у лунки 96-лункової планшети з вихідними та резистентними клітинами, які досліджувалися, додавали 20 мкл розчину МТТ (Sigma, США) (5 мг/мл фосфатно-сольового буферу) та інкубували за тих же умов протягом 3-х годин. Після центрифугування планшету (1500 об/хв, 5хв) видаляли супернатант. Для розчинення кристалів формазапу у кожену лунку додавали 100 мкл диметилсульфоксиду (Serva, Німеччина). Величину оптичного поглинання розчину вимірювали за допомогою мультилункового спектрофотометра (“STAT FAX 2100” США) при довжині хвилі 540 нм (ОП 540).

Кількість живих клітин (X) в кожній лунці планшета виражали у відсотках, розраховуючи за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot 100\%}{A_0},$$

де A_0 - середнє значення оптичної густини в лунках негативного контролю,

A_1 - середнє значення оптичної густини в лунці експериментальної групи.

2.4. Цитоморфологічні дослідження

Морфологічні дослідження клітин РМЗ, що зазнали впливу доксорубіцину та різних режимів ФБМ, проводили після фарбування цитологічних препаратів клітин лінії MCF-7 та MCF-7/Dox за Романовським-Гімза.

Для виготовлення цитологічних препаратів клітини вирощували протягом однієї доби за стандартних умов на покривних скельцях, які знаходилися в стерильних чашках Петрі, заповнених культуральним середовищем. Через добу поверхня скельця була зайнята клітинами на 80%. Скельця діставали з чашок Петрі, відмивали від залишків середовища у фізіологічному розчині та

фарбували за Романовським-Гімза.

На першому етапі фарбування на скельця наносили азур-еозин за Романовським у розведенні 1:5 на 1 хвилину. Потім, не змиваючи барвник, на скельця додавали декілька крапель дистильованої води на 30 секунд. Барвник змивали проточною водою. На другому етапі обробки препаратів проводилось фарбування досліджених клітин розчином Майн-Грюнвальда, який наносили на скельця на 45 секунд з подальшим відмиванням проточною водою та підсушуванням. Препарати досліджували за допомогою імерсійної системи мікроскопа Primo Star (Zeiss, Німеччина) при збільшенні 1000.

2.5. Імуноцитохімічний метод

Для проведення імуноцитохімічного (ІЦХ) аналізу клітини досліджених ліній вирощували на покривних скельцях протягом 1 доби, після чого фіксували розчином метанолу і ацетону у співвідношенні 1:1 протягом 2 годин при $t -20^{\circ}\text{C}$ та досліджували експресію молекулярних маркерів із застосуванням відповідних моноклональних антитіл (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Моноклональні антитіла, які були використані для проведення імуноцито- та імуногістохімічних досліджень

Молекулярний маркер	Клон	Фірма - виробник
Ki-67	MIB-1	DakoCytomation, Denmark
Bax	6A/7	Thermo Scientific, USA
Bcl-2	100/D5	Thermo Scientific, USA
p53	DO-7	Thermo Scientific, USA
циклін D1	AB2070433	Santa Cruz Biotechnology, USA
p21	EA10	Thermo Scientific, USA

Для детекції ІЦХ реакції використовували систему візуалізації Lab Vision™ UltraVision™ Quanto Detection System (кон'юговані вторинні антитіла antiMouse з полімерним ланцюгом декстринової молекули) фірми “Thermo Scientific”, USA, склад якої наведено в табл. 2.2. Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали водою та дофарбовували гематоксиліном Майєра (“Thermo Scientific”, USA) протягом 15 – 30 секунд і вміщували в Faramount Aqueous Mounting Medium (“Thermo Scientific”, USA).

Таблиця 2.2

**Склад реагентів системи візуалізації Lab Vision™ UltraVision™
Quanto Detection System**

№	Назва реагенту	Об'єм
1	UltraVision Hydrogen Peroxide Block	15 мл
2	UltraVision Protein Block	15 мл
3	Primary Antibody Enhancer	15 мл
4	HRP Polymer	15 мл
5	DAB Quanto Substrate	15 мл
6	DAB Quanto Chromogen	1 мл

Для перевірки специфічності взаємодії антитіл і, таким чином, отримання достовірних результатів, кожного разу при проведенні ІЦХ досліджень ставили контрольні реакції.

Аналіз результатів ІЦХ реакції проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин (коричневе забарвлення цитоплазми та/або ядер) за допомогою світлооптичного мікроскопа PrimoStar (Zeiss, Німеччина), використовуючи збільшення x100-400. Для кількісної оцінки експресії досліджених маркерів при ІЦХ дослідженнях використовували метод H-Score за формулою:

$$S = N_0 (\%) + 3 \times N_1 (\%) + 2 \times N_2 (\%) + 1 \times N_3 (\%),$$

де S – показник «H-Score»,

N_0 – кількість клітин з відсутньою експресією,

N_1+ , N_2+ та N_3+ – з низькою, середньою та високою експресією, відповідно.

Кінцевий результат підрахунку виражали у балах:

від 1 до 100 балів – низький,

від 101 до 200 балів – середній,

від 201 до 300 балів — високий рівень експресії.

2.6 Оцінка клітинного циклу

Вивчення вмісту ДНК та аналіз клітинного циклу ліній здійснювали за загальноприйнятою методикою. Клітини в концентрації 1×10^6 клітин в мл в об'ємі 200,0 мкл центрифугуванням (1500 об./хв, 5 хв) у 2 мл фізіологічного розчину. В усі проби додавали по 150 мкл бичачого сироваткового альбуміну та по краплинах, з постійним перемішуванням, 4 мл 70% етанолу, інкубували 1 год при 4 °С. Двічі відмивали проби центрифугуванням (1500 об./хв, 5 хв). Додавали 10 мкл РНК-ази, інкубували 40 хв за 37 °С. Далі додавали 30 мкл пропідію йодиду та інкубували ще 30 хв за 37 °С, потім ще 30 хв за кімнатної температури в темряві. Додавали 2мл фізіологічного розчину, осаджували (5 хв, 1500 об./хв). Надосадову рідину видаляли. Готові проби фіксували 0,1% розчином параформальдегіду та аналізували за допомогою проточного цитофлуориметра Beckman Coulter EPICS® XL (США). Розподіл клітин за фазами клітинного циклу здійснювали за допомогою програми для обробки цитометричних даних ModFit V3.2. Зазначена програма дозволяє аналізувати плоїдність та розподілення клітин пухлини за фазами клітинного циклу і деталізувати кількість клітин у фазах G0/G1, S та G2 + M. Частку клітин з певним вмістом ДНК на гістограмі обчислювали як відсоток від загальної кількості досліджуваних клітин. Індекс проліферації обчислювали як сумарне число клітин пухлини, які знаходяться у S- і G2 + M-фазах клітинного циклу.

2.7. Методика опромінення пухлинних клітин

В ході експериментальних досліджень клітини використовували лазер «Ліка Терапевт М» виробництва «Фотоніка Плюс» з виносними рукоятками ВРВ4 та ВРИП1, які забезпечують лазерне опромінення у червоному та інфрачервоному

оптичних діапазонах з довжиною хвилі 660 та 810 нм відповідно (табл.2.3). Апарат «Ліка-терапевт М» складається з електронного блоку і виносних рукояток з вбудованими лазерними випромінювачами, що роз'ємно приєднуються до електронного блоку. Таке конструктивне виконання апарата дозволяє підключати до одного і того ж електронного блоку різні види виносних рукояток, що генерують лазерне випромінювання видимого та інфрачервоного діапазонів спектру. Апарат «Ліка Терапевт М» забезпечує:

- регулювання і контроль потужності видимого і інфрачервоного випромінювання;
- установку і контроль часу процедури;
- модуляцію випромінювання;
- контроль дози випромінювання.

Таблиця 2.3

Технічні характеристики електронного блока

Назва параметра	Значення
Кількість одночасно працюючих каналів	1
Частота модуляції лазерного випромінювання	0,1-99,9 Гц $\pm$ 10%
Час випромінювання	від 1 сек до 99 хв.59 сек
Реєстрована доза випромінювання	0,01-99,99 Дж $\pm$ 20%
Споживча потужність, не більше	15 Вт
Живлення	220В/50Гц
Габаритні розміри, не більше	245х140х75
Маса, не більше	1,5 кг

Клітини, які використовували у дослідженні, опромінювали у відкритих чашках червоним та інфрачервоним лазерним світлом в різних режимах: терміни опромінення 3, 5, 7 та 10 хвилин та дози опромінення 3, 5, 10 та 15 Дж/см², щільність потужності 50 мВ/см².

2.8. Методи статистичної обробки одержаних результатів

Статистичний аналіз результатів проводили з використанням пакету програмного забезпечення Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Усі дані отримані у трьох повторях і представляли як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення (SD). Для оцінки значущості відмінностей між групами використовували тест Ст'юдента. За критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали $p \leq 0,05$ та $p \leq 0,01$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 ПІДБІР РЕЖИМІВ ОПРОМІНЕННЯ ТА ДОЗ ЦИТОСТАТИКА ДЛЯ КЛІТИН MCF-7 ТА MCF-7/DOX

3.1.1. Визначення режимів лазерного опромінення для клітин ліній MCF-7 та MCF-7/DOX

В ході виконання експериментального дослідження з огляду на дані світової літератури останніх років [18,38,46,50,55], а також власні напрацювання, було запропоновано декілька різних тестових режимів опромінення пухлинних клітин з метою визначення порогових параметрів, на які відбувається відгук культур MCF-7 та які б можна було використовувати у подальших дослідках, поєднуючи дію червоного та інфрачервоного лазера з впливом доксорубіцину. Клітини опромінювали, використовуючи різні дози – 3, 5, 10 та 15 Дж/см², а також різні терміни опромінення 3, 5, 7 та 10 хвилин.

Перший дослід показав, що чутливі до DOX клітини починають реагувати на лазерне червоне світло (660 нм) починаючи з дозування 5 Дж/см² та терміну експозиції 3 хв (табл. 3.1). Але виражена цитотоксична дія була зафіксована лише при використанні дози не менше 10 Дж/см² – з застосуванням різних термінів опромінення. Найбільш помітний цитотоксичний ефект спостерігався при застосуванні дози опромінення до 15 Дж/см² при усіх часових проміжках експозиції (табл. 3.1).

Натомість слід зазначити, що із збільшенням часу опромінення при використанні дози 15 Дж/см² наростання цитотоксичного ефекту не спостерігалось: це стосується як відносно коротких так і більш довгих термінів впливу енергії світла. Надалі, при вивченні впливу інфрачервоного лазерного світла на клітинні лінії MCF-7, було встановлено, що лазерне опромінення із довжиною хвилі 810 нм не призвело до цитотоксичного впливу на пухлинні клітини у режимах від 3 до 10 Дж/см² при різних термінах експозиції (табл. 3.2).

Таблиця 3.1

Вживаність клітин лінії MCF-7 після опромінення лазером 660 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	97,18 ± 0,4	94,25 ± 1,2	93,34 ± 2,2	92,39 ± 1,1
5	86,18 ± 2,2*	94,81 ± 1,4	91,03 ± 0,8	85,56 ± 2,2
10	80,71 ± 4,0*	79,58 ± 2,3*	78,00 ± 2,0*	76,42 ± 3,0*
15	72,87 ± 5,1*	75,07 ± 2,1*	73,55 ± 0,9*	69,14 ± 4,4*

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

Таблиця 3.2

Вживаність клітин лінії MCF-7 після опромінення лазером 810 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	99,09 ± 1,1	96,16 ± 0,9	95,20 ± 2,1	93,91 ± 2,9
5	94,81 ± 0,7	96,67 ± 1,9	92,84 ± 3,9	92,39 ± 3,4
10	93,74 ± 3,1	92,33 ± 1,4	94,25 ± 1,6	94,02 ± 1,7
15	97,63 ± 0,6	83,30 ± 3,3*	85,67 ± 2,9*	86,18 ± 2,2*

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

Натомість із збільшенням дози опромінення до 15 Дж/см² та часу експозиції до 5 хвилин у лінії, чутливої до доксорубіцину спостерігалась загибель близько 15 % клітин. При цьому необхідно зазначити, що із подальшим збільшенням часу опромінення дія лазера не призводила до підвищення ефективності його дії.

Таким чином дослідження показало, що у клітин РМЗ чутливих до доксорубіцину існують різні пороги реактивності при застосуванні лазерного опромінення. При дії червоного лазера (660 нм) відмічається помітна

ефективність впливу навіть впродовж короткого терміну опромінення (3 хв) із застосуванням дози 10 Дж/см². В свою чергу, інфрачервоний лазер із довжиною хвилі 810 нм не спричиняв значущого ефекту доки доза опромінення не була збільшена до 15 Дж/см² при експозиції не менше 5 хвилин.

Натомість, при підборі режимів опромінення клітин, резистентних до доксорубіцину, результати впливу лазера були принципово іншими. З таблиці 3.3 видно, що стабільний цитотоксичний ефект починав фіксуватися лише при дозуванні 15 Дж/см² та при досягненні терміну експозиції у 5 хвилин: показник виживаності становив був 13 % менше у порівнянні з контролем (87,18 %).

Таблиця 3.3

Виживаність клітин лінії MCF-7/Dox після опромінення лазером 660 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	97,10 ± 1,9	94,22 ± 0,8	95,66 ± 1,7	84,69 ± 1,9
5	95,50 ± 2,2	91,78 ± 2,1	92,66 ± 0,9	92,40 ± 1,6
10	90,95 ± 1,7	93,74 ± 1,4	87,18 ± 3,3	91,05 ± 0,7
15	89,50 ± 1,4	85,22 ± 4,4*	86,33 ± 1,6*	85,78 ± 2,9*

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

Надалі при збільшенні дози та при використанні різних термінів експозиції помітних зрушень у виживаності клітин не спостерігалось.

Цікавими представляються результати впливу інфрачервоного лазерного світла на клітини РМЗ людини, резистентні до доксорубіцину. При застосуванні лазерного опромінення у дозах 3 та 5 Дж/см² та різних термінів впливу не було зафіксовано значущої дії на виживаність пухлинних клітин MCF-7/Dox (табл. 3.4).

Виживаність клітин лінії MCF-7/Dox після опромінення лазером 810 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	95,50 ± 0,7	94,73 ± 2,1	94,73 ± 0,9	93,02 ± 2,0
5	94,26 ± 0,4	93,33 ± 1,9	92,76 ± 1,3	97,10 ± 0,4
10	97,93 ± 2,1	94,16 ± 1,4	97,41 ± 0,5	95,35 ± 0,6
15	93,64 ± 3,4	89,81 ± 0,9	86,76 ± 2,0*	85,52 ± 1,9*

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

Але коли доза опромінення була збільшена до 15 Дж/см², у цитотоксичній дії були помічені відчутні зміни: виживаність клітин зменшувалася із наростанням термінів експозиції культури під дією інфрачервоного лазерного світла.

Таким чином, можна зробити обґрунтований висновок, що лазерне опромінення чинить вплив на виживаність пухлинних клітин MCF-7 та MCF-7/Dox: якщо червоний лазер із довжиною хвилі 660 нм спричиняє цитотоксичний ефект починаючи з дозування 5 Дж/см² та терміну експозиції 3 хвилини, а також викликає виражену цитотоксичну дію при використанні доз 10 і 15 Дж/см², то інфрачервоне лазерне опромінення не провокує такі ефекти у режимах від 3 до 10 Дж/см² при різних термінах експозиції. Найбільша протипухлинна активність лазера спостерігалася при 15 Дж/см² та експозиції не менше 5 хвилин.

При використанні інфрачервоного лазерного світла для впливу на резистентну клітинну лінію MCF-7/Dox застосування відносно невисоких доз опромінення 3 та 5 Дж/см² не призвело до помітного зниження показників виживаності пухлинних клітин. І згодом, коли у наступних дослідах доза була збільшена до 15 Дж/см², цитотоксичний ефект почав наростати, у тому числі в

залежності від термінів експозиції клітин під дією інфрачервоного опромінення.

Отримані результати дозволяють констатувати, що найбільш чутливими до дії лазера є клітини, чутливі до доксорубіцину. При цьому слід відзначити, що інфрачервоне лазерне світло чинить цитотоксичний ефект лише у дозі 15 Дж/см^2 на клітини обох досліджених ліній. Тому такі параметри опромінення були враховані для використання у подальших експериментах.

3.1.2. Визначення ефективних доз доксорубіцину для клітин ліній MCF-7 та MCF-7/Dox

З метою підбору доз цитостатика для подальших дослідів була використана оцінка виживаності клітин культуральних ліній MCF-7 та MCF-7/Dox та застосовані різні дозування доксорубіцину, які також приводяться у різних авторів на сучасному етапі [77,79,81,83]. З цією метою до клітин досліджених ліній додавали цитостатик у діапазоні доз від 0,5 до 3,0 мкг/мл та оцінювали виживаність з використанням МТТ-тесту.

В результаті дослідження встановлено, що доксорубіцин у дозі 0,5 мкг/мл викликав загибель 15 % клітин лише у лінії MCF-7. Застосування цитостатика у дозі 1,0 мкг/мл спричиняло загибель більше 20 % клітин чутливої та близько 16 % клітин, резистентної лінії. Під впливом доксорубіцину у дозі 2,0 та 3,0 мкг/мл кількість загинувих клітин у лінії MCF-7 дорівнювала 30 % та 55 %, що відповідало IC30 та IC50 (табл. 3.5.).

У свою чергу, резистентна до доксорубіцину культура на застосування доксорубіцину у дозуванні 0,5 мкг/мл та 1,0 мкг/мл не реагувала збільшенням цитотоксичного ефекту, тенденція до досягнення IC30 проявилася лише при дозуванні 2,0 мкг/мл та 3,0 мкг/мл, а рівня ефективності IC50 так і не вдалося досягти.

Вживаність клітин ліній та MCF-7 та MCF-7/Dox після дії різних доз доксорубіцину

Культура	Концентрація доксорубіцину, мкг/мл			
	0,5	1,0	2,0	3,0
	Кількість живих клітин, %			
MCF-7	84,19 ± 2,1	77,68 ± 1,7*	70,27 ± 2,5*	45,31 ± 4,4*
MCF-7/Dox	99,99 ± 2,6*	83,42 ± 3,3*	76,18 ± 2,0*	73,48 ± 1,9*

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

Отримані результати дозволили встановити дози у 0,5 мкг/мл та 2,0 мкг/мл як критичні для окреслення протипухлинного діапазону доксорубіцину по відношенню до обраних клітинних ліній в контексті вивчення поєднаного впливу цитостатика та лазерного опромінення на виживаність пухлинних клітин.

3.2. ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ДОКСОРУБІЦИНУ ТА ЛАЗЕРНОГО ОПРОМІНЕННЯ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО КЛІТИН MCF-7 ТА MCF-7/Dox

3.2.1. Вивчення впливу доксорубіцину та лазерного випромінювання по відношенню до клітин лінії MCF-7

На наступному етапі експериментальної роботи, використовуючи дані світової літератури останніх років [38,46,105,143,153], а також власні напрацювання, було запропоновано декілька режимів опромінення пухлинних клітин у поєднанні з доксорубіцином: до клітин додавали цитостатик у діапазоні доз 0,5 та 2,0 мкг/мл, після цього клітини опромінювали, використовуючі різні дози – 3, 5, 10 та 15 Дж/см², а також різні терміни опромінення – 3, 5, 7 та 10 хвилин.

В результаті дослідження встановлено, що чутливі до DOX клітини практично не реагують на вплив DOX у дозі 0,5 мкг/мл у поєднанні з червоним

лазерним світлом (660 нм) при дозах опромінення 3 та 5 Дж/см² та різних термінах впливу (табл. 3.6).

Таблиця 3.6.

Виживаність клітин лінії MCF-7 після впливу доксорубіцину у дозі 0,5 мкг/мл та опромінення лазером з довжиною хвилі 660 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	99,11± 0,4	96,12± 2,3	90,90 ± 2,5	94,25 ± 2,0
5	95,71± 2,2	105,49 ± 0,5	101,31 ± 1,3	95,19 ± 2,0
10	90,58± 0,6	93,72 ± 1,3	96,18 ± 1,1	94,25 ± 1,8
15	86,87± 2,0*	93,41 ± 1,1*	70,61 ± 2,1*	70,82 ± 2,3*

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

Збільшення дози опромінення до 10 та 15 Дж/см² та часу експозиції 3 та 5 хвилин викликало зменшення показника виживаності клітин лінії MCF-7 на 10% у порівнянні з контролем. Досягнення IC30 після дії доксорубіцину у концентрації 0,5 мкг/мл зафіксоване при застосуванні лазерного опромінення впродовж 7 хв у дозі у 15 Дж/см². Слід зазначити, що подовження часу опромінення до 10 хв не призводило до зростання цитотоксичної активності доксорубіцину. При збільшенні концентрації доксорубіцину до 2,0 мкг/мл у поєднанні з червоним лазером спостерігалася принципово інша реакція культури MCF-7 - був зафіксований цитотоксичний вплив як при відносно низьких так і при відносно високих дозах опромінення. При цьому слід зазначити, що цитотоксична дія проявлялася навіть при мінімальному часі опромінення (табл. 3.7.).

Досягти показника IC30 вдалося при дозах 3 та 5 Дж/см² та при усіх обраних термінах опромінення; також, аналізуючи вплив дози 5 Дж/см², можна відзначити, що збільшення терміну дії лазера з 5 до 10 хвилин призвело до зростання цитотоксичного ефекту доксорубіцину. Застосування високих доз

опромінення (10 та 15 Дж/см²) призводило до більш суттєвого підвищення цитотоксичної дії доксорубіцину у концентрації 2,0 мкг/мл по відношенню до клітин лінії MCF-7. При всіх термінах лазерного впливу від 3 до 10 хвилин зафіксована цитотоксична ефективність на рівні IC50, тобто більша доза опромінення у поєднанні з цитостатиком мала кращий цитотоксичний ефект. Слід зауважити, що збільшення терміну експозиції до 10 хвилин при вказаних дозах не призводило до підвищення цитотоксичної активності.

Таблиця 3.7.

Виживаність клітин лінії MCF-7 після впливу доксорубіцину у дозі 2,0 мкг/ та опромінення лазером з довжиною хвилі 660 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	80,75 ± 3,3*	78,29 ± 1,7*	74,01 ± 4,0*	76,78 ± 4,1*
5	78,09 ± 4,1*	85,93 ± 1,4*	82,53 ± 0,9*	77,56 ± 2,4*
10	53,40 ± 2,0*	52,35 ± 0,9*	53,77 ± 0,9*	52,67 ± 2,2*
15	54,60 ± 4,4*	56,28 ± 2,4*	55,13 ± 1,4*	51,83 ± 0,8*

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

Застосування інфрачервоного лазера у поєднанні з доксорубіцином у концентрації 0,5 мкг/мл не викликало помітного інгібуючого впливу на клітини лінії MCF-7. Збільшення доз опромінення та термінів опромінення також не призводило до підвищення цитотоксичної активності доксорубіцину у концентрації 0,5 мкг/мл по відношенню до клітин лінії MCF-7 (табл.3.8).

При аналізі цитотоксичного впливу доксорубіцину до 2,0 мкг/мл у поєднанні з інфрачервоним лазером з'ясовано, що виживаність клітин лінії поступово знижується лише при застосуванні лазерного опромінення у дозі 15 Дж/см² починаючи з 5 хвилин експозиції (табл. 3.9).

Таблиця 3.8

Вживаність клітин лінії MCF-7 після впливу доксорубіцину у дозі 0,5 мкг та опромінення лазером з довжиною хвилі 810 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	95,50 ± 0,8	105,07 ± 2,1	100,89 ± 0,5	94,82 ± 2,2
5	109,15 ± 1,1	105,86 ± 2,2	91,16 ± 3,3	103,77 ± 2,5
10	96,44 ± 0,7	106,12 ± 0,6	101,88 ± 2,1	95,76 ± 2,9
15	106,96 ± 1,3	103,71 ± 0,6	89,38 ± 0,4	101,67 ± 0,6

Таблиця 3.9

Вживаність клітин лінії MCF-7 після впливу доксорубіцину у дозі 2,0 мкг та опромінення лазером з довжиною хвилі 810 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	93,57 ± 0,4	102,93 ± 2,6	98,85 ± 1,4	92,89 ± 4,4
5	105,51 ± 1,6	103,71 ± 0,9	98,54 ± 1,0	101,67 ± 0,6
10	94,51 ± 2,6	103,97 ± 0,7	110,09 ± 0,8	93,62 ± 2,0
15	100,89 ± 3,3	72,19 ± 0,6*	66,47 ± 0,4*	65,43 ± 1,1*

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

Резюмуючи отримані дані, можна зробити висновок, що лазерне світло низької енергії здатне при визначених параметрах діяти як фактор, який покращує цитотоксичну активність доксорубіцину: досягнення IC30 та IC50 зафіксоване при дозуваннях 0,5 мкг/мл та 2,0 мкг/мл відповідно, чого не відмічалось при аналогічній концентрації DOX без застосування лазера.

Цитотоксичні ефекти у клітинних лініях MCF-7 проявляється по різному: якщо дія комбінації різних концентрацій DOX (0,5 та 2,0 мкг/мл) у поєднанні з червоним лазером (660 нм) проявляє певну залежність як від дози опромінення так і від терміну експозиції, то інфрачервоний лазер (810 нм) спрацьовує у поєднанні з цитостатиком спорадично, в деяких випадках навіть зменшуючи цитостатичну дію DOX, а найбільша протипухлинна ефективність фіксується при максимальній дозі опромінення.

3.2.2. Вивчення впливу доксорубіцину та лазерного випромінювання по відношенню до клітин лінії MCF-7/Dox

При вивченні впливу доксорубіцину та енергії світла на клітини, резистентної до цитостатику лінії MCF-7/Dox було встановлено, що застосування червоного лазерного опромінення навіть у високих дозах та при максимальних термінах експозиції не призводило до підвищення його цитотоксичної активності у концентрації 0,5 мкг/мл більш ніж на 13 %. (табл. 3.10.).

Таблиця 3.10.

Вживаність клітин лінії MCF-7/Dox після впливу доксорубіцину у дозі 0,5 мкг та опромінення лазером з довжиною хвилі 660 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	93,62 ± 0,4	88,32 ± 2,1*	90,94 ± 0,7	90,15 ± 0,7
5	86,06 ± 4,1*	94,65 ± 2,2	90,90 ± 1,0	85,41 ± 2,0*
10	90,66 ± 2,0	93,57 ± 0,9	89,68 ± 1,3	84,56 ± 0,8*
15	93,34 ± 3,3	96,39 ± 0,9	92,35 ± 1,9	87,10 ± 1,1*

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

Аналогічна тенденція спостерігалася у групах із застосуванням концентрації DOX 2,0 мкг/мл (табл. 3.11). Якщо при дозах опромінення 3 та

5 Дж/см² протипухлинної дії запропонованого терапевтичного протоколу зафіксовано не було, то при параметрах 10 та 15 Дж/см² і максимальних термінах експозиції проявилася тенденція до інгібуючого впливу на пухлинні клітини: показник виживаності відрізнявся від такого у контролі на 20 %.

Таблиця 3.11.

Виживаність клітин лінії MCF-7/Dox після впливу доксорубіцину у дозі 2,0 мкг та опромінення лазером з довжиною хвилі 660 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	95,82 ± 1,0	93,95 ± 3,3	49,51 ± 4,8*	94,51 ± 1,4
5	98,03 ± 3,1	100,99 ± 0,4	98,92 ± 1,1	93,01 ± 1,0
10	84,33 ± 2,0*	82,68 ± 1,0*	84,89 ± 2,5*	83,15 ± 1,8*
15	86,25 ± 1,3*	88,83 ± 1,2*	87,05 ± 1,4*	81,65 ± 1,8*

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

На відміну від впливу червоного лазера, ефект світла з довжиною хвилі 810 нм на цитотоксичну активність доксорубіцину у концентрації 0,5 мкг/мл починає проявлятися вже на рівні дози опромінення 5 Дж/см² і продовжує наростати як із збільшенням доз так і з збільшенням термінів експозиції (табл. 3.12).

Примітно, що тенденція до досягнення IC₃₀ проявляється вже при параметрах опромінення 5 Дж/см² та експозиції 7 хвилин. Надалі, при збільшенні доз опромінення до 10 та 15 Дж/см² та часу впливу лазерного світла показник виживаності клітин лінії MCF-7/Dox зменшується, чого не відбувалося із застосуванням аналогічної дози DOX без впливу лазерного опромінення.

При застосування інфрачервоного лазерного опромінення у поєднанні з доксорубіцином у концентрації 2,0 мкг/мл Зафіксовано тенденцію до

досягнення IC30 вже при використанні опромінення з дозою 3 Дж/см² протягом 7 хвилин та стає ще більш вираженою зі збільшенням його параметрів (табл. 3.13).

Таблиця 3.12.

Вживаність клітин лінії MCF-7/Dox після впливу доксорубіцину у дозі 0,5 мкг та опромінення лазером з довжиною хвилі 810 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	95,78 ± 0,8	90,33 ± 2,1	88,78 ± 1,1*	92,21 ± 0,8
5	93,34 ± 0,3	85,83 ± 1,9*	84,37 ± 0,6*	87,61 ± 2,4*
10	90,05 ± 0,4	84,94 ± 1,5*	83,48 ± 1,2*	86,67 ± 2,2*
15	82,82 ± 1,8*	72,88 ± 1,3*	70,95 ± 0,9*	73,67 ± 0,9*

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

Більш того, цитотоксичний ефект поєднаної дії інфрачервоного лазера та DOX ставав більш значущим вже при використанні дози опромінення 5 Дж/см² і часі впливу 5 хвилин, чого не спостерігалось при аналогічних параметрах у чутливій до доксорубіцину культурі РМЗ людини.

Таблиця 3.13.

Вживаність клітин лінії MCF-7/Dox після впливу доксорубіцину у дозі 2,0 мкг та опромінення лазером з довжиною хвилі 810 нм

Доза опромінення (Дж/см ²)	Час опромінення (хв)			
	3	5	7	10
	Кількість живих клітин, %			
3	90,99 ± 2,8	84,05 ± 2,2*	82,59 ± 1,8*	92,12 ± 0,6
5	86,81 ± 0,4*	79,82 ± 2,1*	81,89 ± 2,0*	81,46 ± 3,8*
10	93,29 ± 0,7	82,87 ± 1,81	83,58 ± 1,7*	80,62 ± 4,0*
15	82,78 ± 0,8*	56,12 ± 1,1*	51,81 ± 0,4*	56,83 ± 0,6*

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

Отримані дані свідчать, що застосування саме інфрачервоного лазера із дозою опромінення до 15 Дж/см^2 призводить до найбільш значущої цитотоксичної дії доксорубіцину. При термінах лазерного впливу від 5 до 10 хвилин зафіксована цитотоксична ефективність доксорубіцину по відношенню до клітин лінії MCF-7/Dox, яка дорівнює IC50.

Таким чином, застосування лазерного опромінення з різними дозами доксорубіцину сприяє суттєвому підвищенню його цитотоксичної активності по відношенню до клітин резистентної лінії. Про це свідчить окреслення тенденції до досягнення IC30 при параметрах опромінення 3 Дж/см^2 і 7 хвилин, а також значущий протипухлинний ефект поєднаної дії інфрачервоного лазера та DOX при дозі опромінення 5 Дж/см^2 і часі впливу 5 хвилин, чого не спостерігалось при аналогічних параметрах у чутливій до доксорубіцину культурі РМЗ людини.

А найбільш цікавий результат проведеного етапу дослідницької роботи – це досягнення цитотоксичної ефективності на рівні IC50 із застосуванням саме інфрачервоного світла (810 нм), чого не вдавалося раніше зробити як за допомогою запропонованих концентрацій DOX без застосування лазерного опромінення, так і при поєднаному впливі доксорубіцину і червоного лазера (660 нм).

Викладені у підрозділах 3.1 та 3.2 результати опубліковано у [175,177].

3.3. ВИВЧЕННЯ ЦИТОМОРФОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ ВПЛИВУ ЧЕРВОНОГО ТА ІНФРАЧЕРВОНОГО ЛАЗЕРНОГО ОПРОМІНЕННЯ У ПОЄДНАННІ З ДОКСОРУБІЦИНОМ НА ЧУТЛИВІ ТА РЕЗИСТЕНТНІ КЛІТИНИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

На сьогодні цитоморфологічне дослідження залишається одним з ключових доказових методів експериментальної онкології, оскільки його використання надає можливість скласти об'єктивне уявлення про морфологічні особливості дослідженого об'єкту і на цій підставі представити конкретні характеристики дії фізико-хімічних факторів. Враховуючи зазначене, задача

цього фрагменту роботи полягала у цитоморфологічному дослідженні клітин раку молочної залози людини лінії MCF-7, чутливих та резистентних до доксорубіцину, після поєднання дії цитостатика і лазерного опромінення.

3.3.1. Дослідження цитоморфологічних особливостей чутливих до цитостатиків клітин раку молочної залози людини лінії MCF-7

Отримані у попередніх дослідах дані корелюють із результатами морфологічної оцінки пухлинних клітин після застосування доксорубіцину і лазерного опромінення за допомогою світлової мікроскопії.

На цитоморфологічному рівні клітини РМЗ людини лінії MCF-7 мали неправильну форму і різні розміри, невеликий або навпаки великий об'єм цитоплазми інтенсивного чи блілого забарвлення та ядро великого розміру. Хоча ядра клітин були у багатьох клітин збільшеного розміру, між собою вони зберігали відмінність за формою: переважна більшість були округлими, решта – овальними або витягнутими у вигляді еліпсу. В поодиноких клітинах зустрічалися фрагментовані ядра, ядра з інвагінаціями або ядра, які заповнювали собою майже весь об'єм клітини. Якщо у групі контролю клітини MCF-7 демонстрували активний ріст, клітини були розташовані суцільним пластом, з утворенням анастомозів, нашарувань, осередків структур на кшталт симпластів (рис.3.1), то у групах з опроміненням та без доксорубіцину спостерігалось утворення окремих скупчень клітин с нашаруванням, з утворенням ніш, появою поодиноких гігантських клітин з великими ядрами. Ріст клітин був несиметричним, клітини були розташовані у вигляді ланцюжків або тяжів, розеток та скупчень на кшталт грона винограду. Розташування клітин парами та невеликими групами, а також наявність в препараті або близько розташованих або поєднаних клітинних елементів різних розмірів свідчить про велику кількість мітозів (рис.3.2, рис.3.3.).

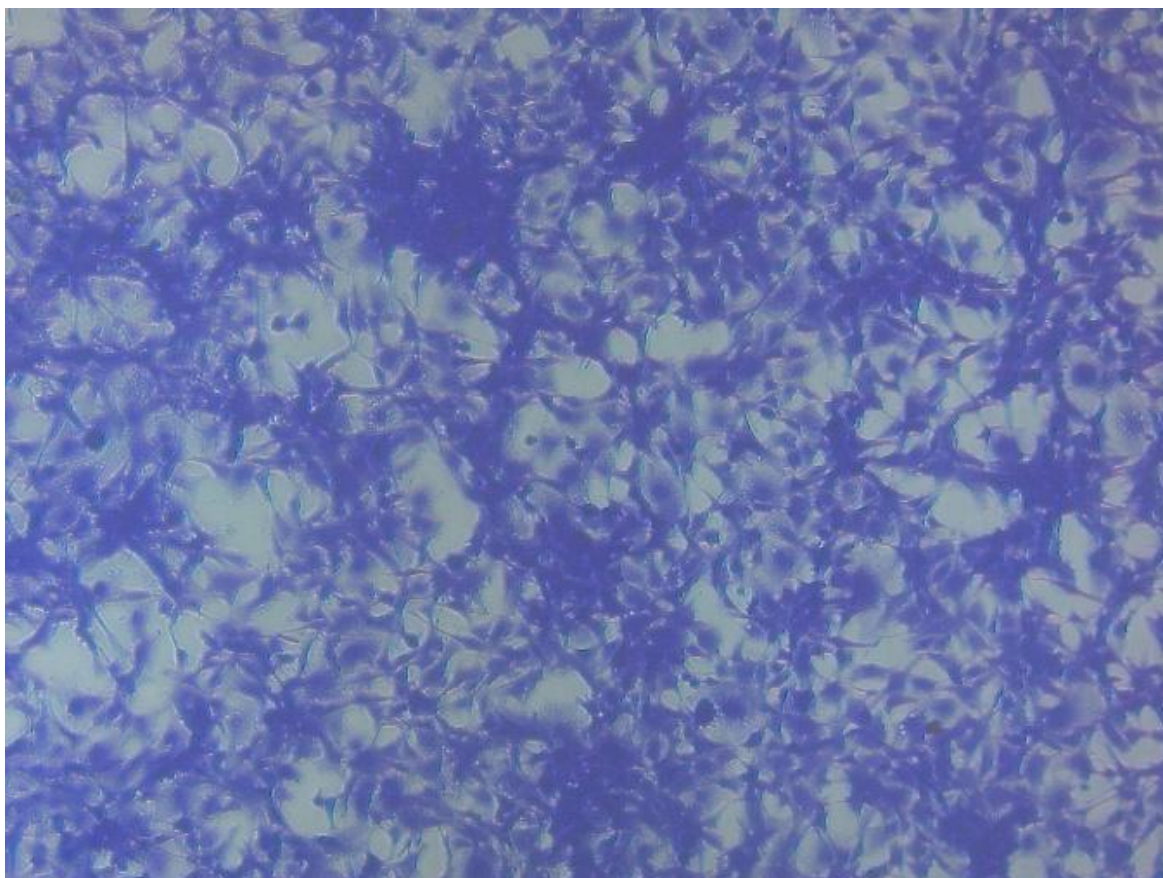


Рис.3.1. Мікрофотографія клітин MCF7. Активний ріст клітин, клітини розташовані суцільним пластом, з утворенням ніш та анастомозів, нашарувань, осередків структур на кшталт симпластів. Зафарбування за Романовським-Гімза x200.

У всіх препаратах клітинної лінії MCF-7 без застосування доксорубіцину виявлено значну кількість клітин, розташованих у групах – не менше 50 %. Клітини полігональної форми превалювали над трапецієподібними та веретеноподібними клітинами. Треба відзначити, що близько 60 % пухлинних клітин мали дрібні та середні, а близько 40 % – відносно великі розміри. Переважна більшість клітин мала цитоплазму слабкого та помірного ступеня забарвлення, а до 30 % клітин інтенсивно накопичували барвник. Виявлено значну кількість пухлинних клітин з гіперхромними ядрами та розвиненою світлою цитоплазмою. У переважної більшості пухлинних клітин MCF-7 був відмічений виражений поліморфізм: клітини різних розмірів були як неправильної полігональної так і округлої форми, містили ексцентрично розташоване ядро, були з'єднані між собою за допомогою відростків різної

форми та довжини. Ядра клітин були різних розмірів – великі (35-40 %), середні (45-50 %) і дрібні (5-10 %), та у переважної більшості клітин ядерно-цитоплазматичне співвідношення було на користь ядра.

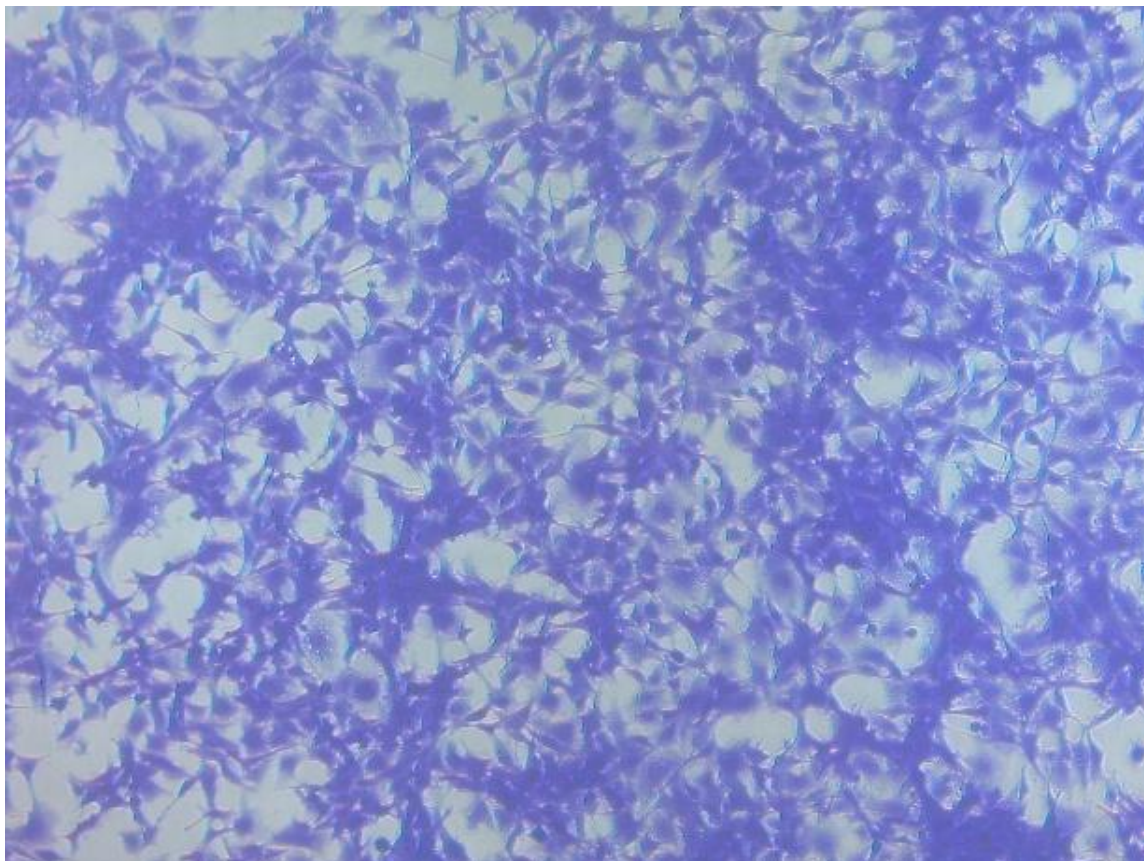


Рис.3.2. Мікрофотографія клітин MCF7 після опромінення лазером 660 нм без доксорубіцину. Активний ріст, утворення окремих груп клітин с нашаруванням, з утворенням ніш та анастомозів. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

Також слід додати, що в препаратах чутливої до доксорубіцину культури, ріст клітин був схожим за розташуванням окремих груп клітин та за утворенням між ними характерних мікропорожнин. Такі порожнини чередувалися з невеликими гніздами, а також різними за величиною осередками або значними скупченнями пухлинних клітин. В деяких порожнинах зустрічалися відокремлені клітини, а в деяких – відростки клітин утворювали нерівномірну сітчасту структуру.

Характерною рисою при розташуванні скупчень клітин в мікропрепаратах була тенденція до нашарування, яке ймовірно було наслідком

нерівномірного поділу та росту клітинних елементів і їхньої конкуренції за життєвий простір. Скупчення клітин та мікропорожнини, окремі клітини та їх відростки створювали асиметричний малюнок (рис.3.3).

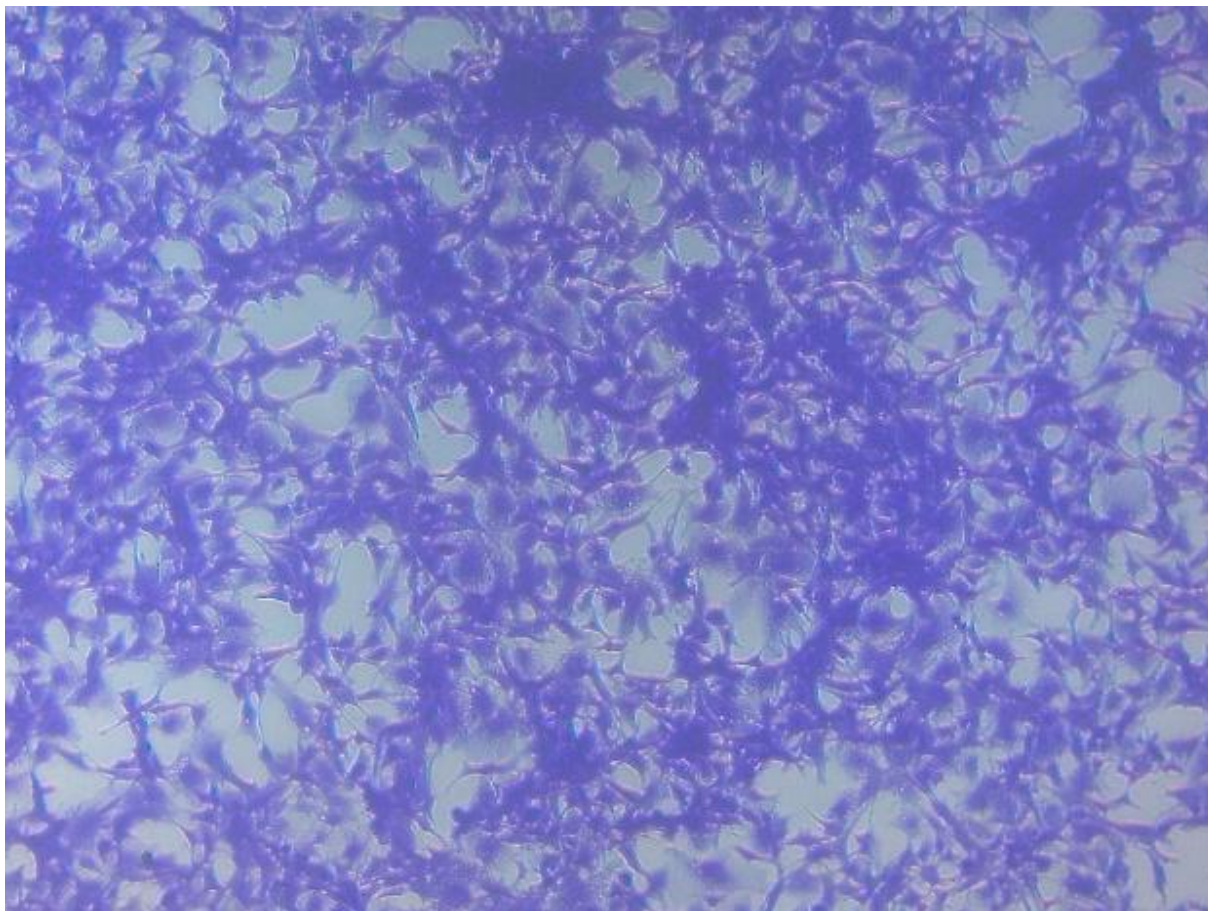


Рис.3.3. Мікрофотографія клітин MCF7 після опромінення лазером 810 нм без доксорубіцину. Активний ріст клітин, клітини розташовані суцільним пластом, з утворенням ніш та анастомозів, нашарувань, осередків структур на кшталт симпластів, поява поодиноких гігантських клітин з великими ядрами. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

При додаванні до клітин доксорубіцину без застосування лазерного опромінення було зафіксоване моношарове розростання пухлинних клітин з утворенням великих порожнин та окремих груп клітин. Клітини набули забарвлення низького та середнього ступеня інтенсивності та утворили сітчасту структуру, у якій прослідковувалася тенденція до скупчення відносно невеликих та веретеноподібних клітин навколо гігантських клітин з великими

ядрами. Порожнини між скупченнями клітин великого розміру, містять окремі поодинокі клітини з великими відростками і ознаками дистрофії. Близько 50 % пухлинних клітин мали дрібні розміри, переважна більшість клітин мала цитоплазму слабого та помірного ступеня забарвлення. Поліморфізм пухлинних клітин проявлявся їх неправильною полігональною, трапецієподібною та овальною формою, клітини містили ексцентрично розташоване ядро, у 70-80 % клітин ядерно-цитоплазматичне співвідношення було зсунуте у бік ядра. Помітно, що нашарування клітин чередуються з клітинами, розташованими у вигляді моношару (рис.3.4).

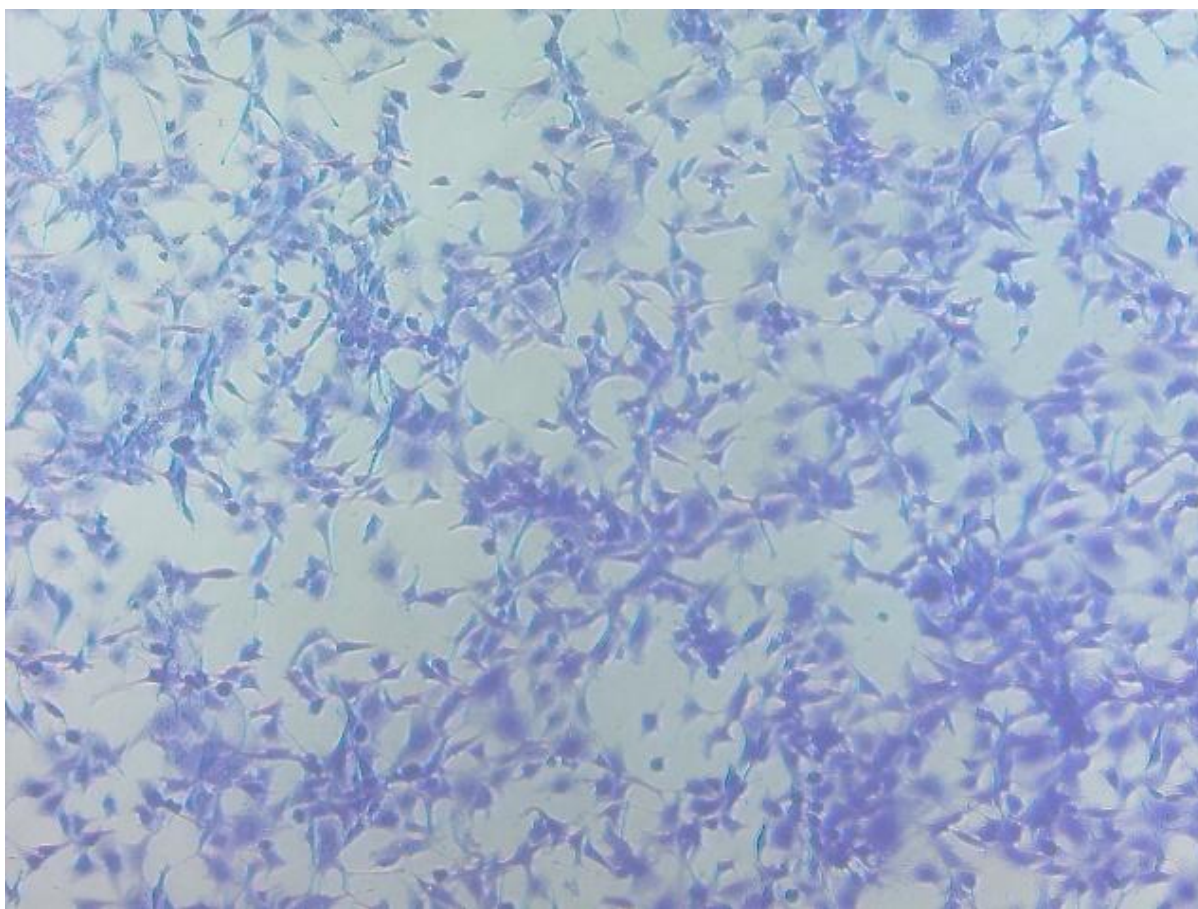


Рис.3.4. Мікрофотографія клітин MCF7 після впливу доксорубіцину (2,0 мкг/мл). Моношарове розростання пухлинних клітин з утворенням великих порожнин та окремих груп клітин. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

Натомість при поєднанні доксорубіцину з червоним лазерним опроміненням у препаратах клітини були розташовані у вигляді моношару із помітно меншою щільністю. Лазер з довжиною хвилі 660 нм спричиняв

інгібування росту клітин у поєднанні з доксорубіцином як у концентрації 2,0 так і у 0,5 мкг/мл.

Відмінною рисою клітинних ліній, на які вплинуло червоне лазерне опромінення з довжиною хвилі 660 нм у поєднанні з доксорубіцином, було саме моношарове розташування клітин, а окремі, навіть поодинокі ділянки нашарувань клітин зустрічалися лише у поєднанні з появою гігантських клітин з великими ядрами. Асиметрична сітчаста структура, яку утворили тяжі та скупчення пухлинних клітин різної форми та різних розмірів, має схожу побудову як після застосування доксорубіцину у дозах 2,0 мкг/мл так і 0,5 мкг/мл.

Також не зайвим буде зазначити, що в цих препаратах вперше зустрічаються клітини, які позбавлені цитоплазми і складаються лише з ядер та рештків мембран, а також гігантські клітини неправильної форми з гіперхромними ядрами. Клітинні елементи демонстрували поліморфізм, у окремих клітин цитоплазма ставала подовженою або відростчастою, ядра мали злегка витягнуту або неправильну форму (рис.3.5).

Дегенеративні зміни у клітинах проявлялися не тільки руйнуванням цитоплазми та фрагментацією ядер, але й також відривом окремих відростків клітин, які потрапляли у порожнини. Деякі відростки цитоплазми утворювали мікроворсинки, які нагадували натягнуті нитки та підтримували зв'язок між окремими клітинами або групами клітин (рис.3.6).

Найбільш вираженим виявився цитотоксичний вплив саме інфрачервоного лазера (810 нм) після експозиції з доксорубіцином. При цитоморфологічному дослідженні було встановлено, що найбільш характерними ознаками чутливих до цитостатичного впливу клітин після поєднаного впливу лазера та 2,0 мкг/мл доксорубіцину були їх дрібні розміри, поліморфізм, розташування або розрізнене, або у невеликих скупченнях (рис.3.7).

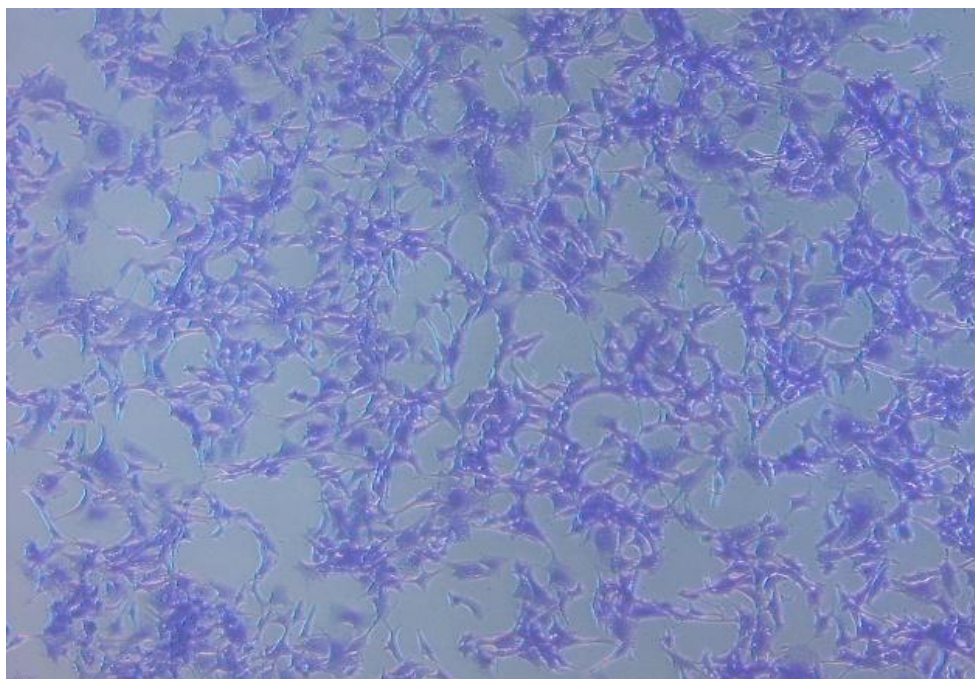


Рис.3.5. Мікрофотографія клітин MCF7 після поєднаного впливу DOX (2,0 мкг/мл) та червоного лазерного опромінення (660 нм). Ріст пухлинних клітин у вигляді сітчастої структури з прорідженням, окремі анастомози за участю відростків клітин. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

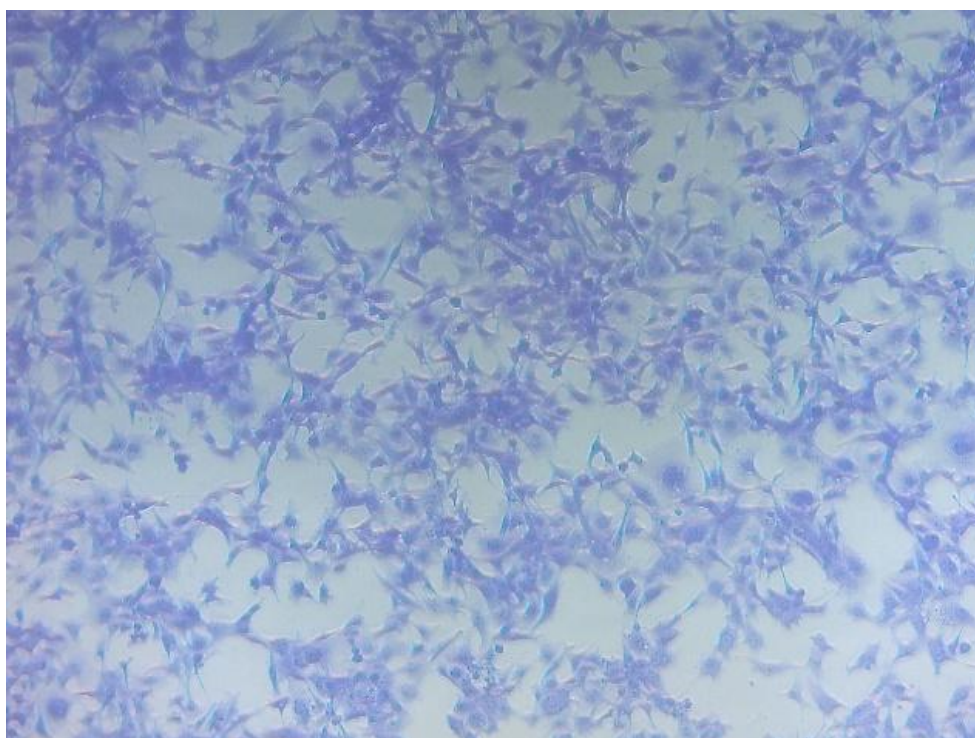


Рис.3.6. Мікрофотографія клітин MCF-7 після поєднаного впливу DOX (0,5 мкг/мл) та червоного лазерного опромінення (660 нм). Моношарове розростання пухлинних клітин з утворенням великих порожнин, окремими клітинами та групами клітин. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

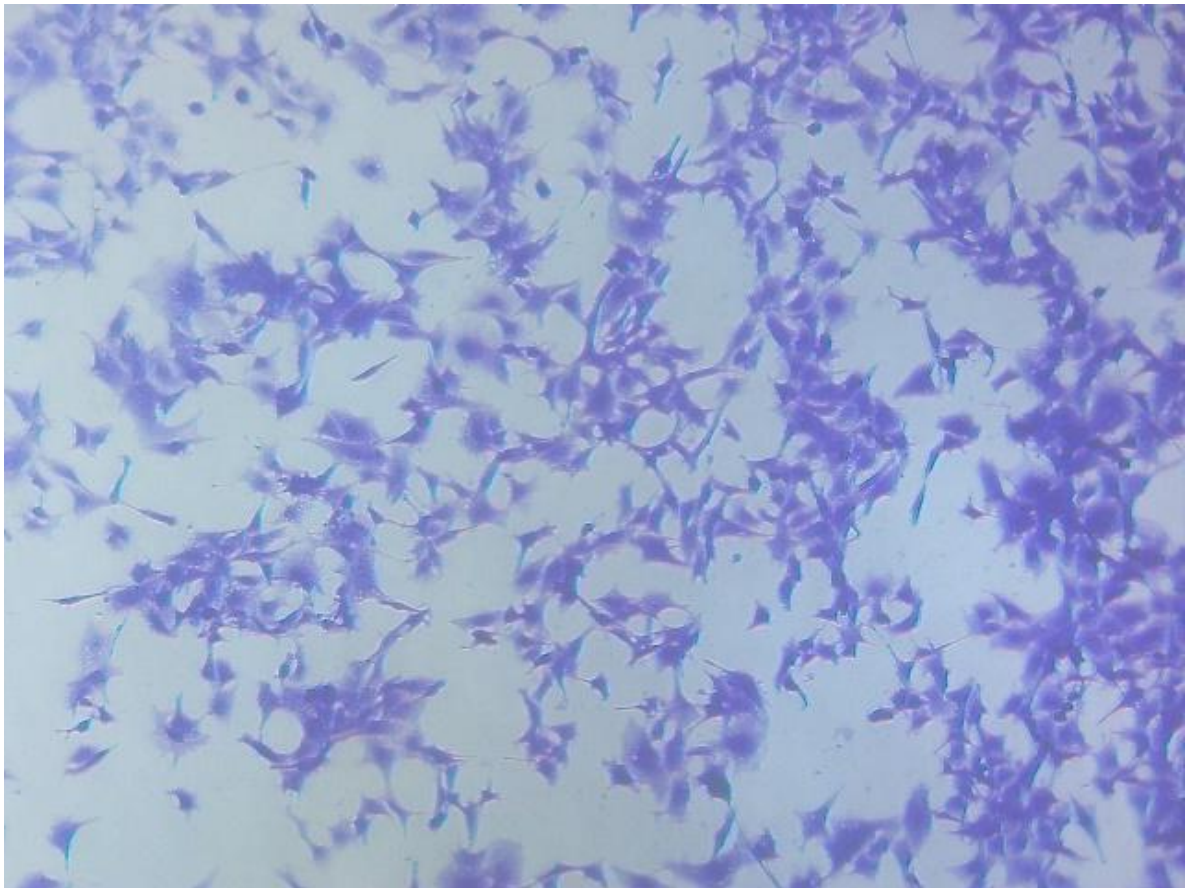


Рис.3.7. Мікрофотографія клітин MCF-7 після поєднаного впливу DOX (2,0 мкг/мл) та інфрачервоного лазерного опромінення (810 нм). Ріст пухлинних клітин у вигляді сітчастої структури з прорідженням, окремі анастомози за участю відростків клітин. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

Після поєднання лазерного опромінення з доксорубіцином у дозі 0,5 мкг/мл у лінії MCF-7, навпаки, превалювали великі та гігантські клітини з гіперхромними ядрами, які мали полігональну та веретеноподібну форму з численним відростками, та утворювали сітчасту структуру.

При цьому слід зазначити, що клітини лінії MCF-7 росли з утворенням груп та окремих нашарувань, сітчаста структура була з прорідженням, клітини утворювали анастомози за участю відростків. Також спостерігалися розриви цілісних ланцюгів пухлинних клітин з утворенням мікропорожнин, наявність окремих клітин у порожнинах, поява гігантських клітин з великими гіперхромними ядрами; у деяких клітинах – можна побачити декілька ядер або сегментовані і деформовані ядра, а в деяких цитоплазма майже відсутня. (рис.3.8).

Окремо слід підкреслити, що розростання клітин лінії MCF-7 з утворенням великих порожнин та окремих груп клітин було нерівномірним. Клітини набували забарвлення переважно середнього ступеня інтенсивності та утворили сітчасту структуру. Порожнини між скупченнями клітин містять не тільки окремі поодинокі клітини з великими відростками і ознаками дистрофії, але й фрагменти клітин. Не менше 30 % пухлинних клітин мають дрібні, а 40 – 50 % відносно великі розміри, близько 30 % клітин мають розвинену цитоплазму, а близько 70 % ядерно-цитоплазматичне співвідношення на користь ядра.

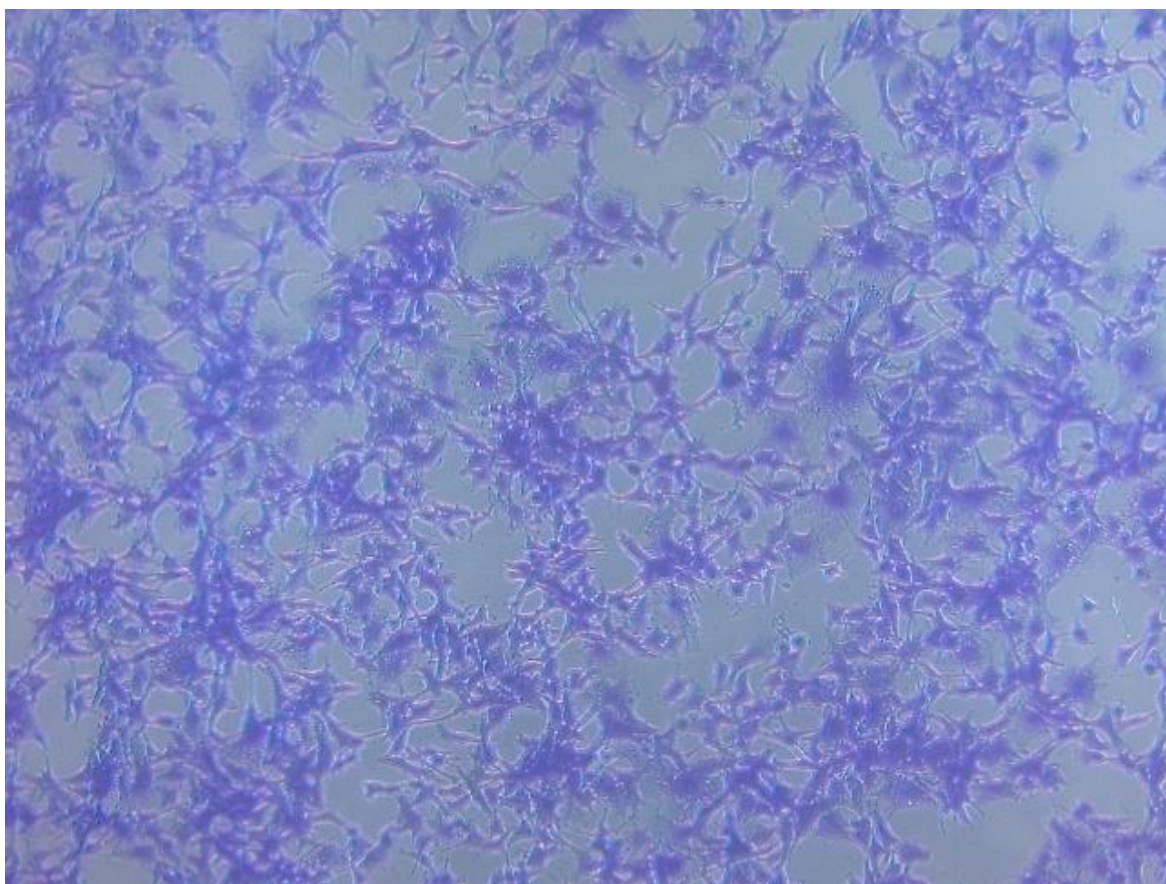


Рис.3.8. Мікрофотографія клітин MCF-7 після поєднаного впливу доксорубіцину (0,5 мкг/мл) та інфрачервоного лазерного опромінення (810 нм). Моношарове розростання пухлинних клітин з прорідженням, окремі анастомози за участю відростків клітин, гігантські клітини з великими ядрами. Зафарбування за Романовським- Гімза x200

Цитоморфологічна оцінка мікропрепаратів показала, що у порівнянні з групою контролю та застосуванням лазерів у монорежимах, приєднання до

терапевтичного протоколу хіміотерапевтичного препарату кардинально змінює характеристики пухлинних клітин.

Якщо у групі контролю клітини MCF-7 демонстрували активний ріст, клітини були розташовані суцільним пластом, з утворенням анастомозів, нашарувань, осередків структур на кшталт симпластів, то лазери у монорежимах провокували утворення ніш та появу поодиноких гігантських клітин з великими ядрами. Одночасно з дистрофічними змінами спостерігався активний поділ клітин, який призвів до розташування клітин парами та невеликими групами, у вигляді ланцюжків або тяжів, розеток та скупчень на кшталт грона винограду.

При поєднанні цитостатика та червоного лазерного опромінення (660 нм) спостерігалася дещо інша картина: клітини наростали у вигляді моношару, а поодинокі ділянки нашарувань зустрічалися тільки за участі гігантських клітин з великими гіперхромними ядрами.

Поєднання дії доксорубіцину і лазерного опромінення спричинило такі зміни, які не зустрічалися у контролі та при застосуванні опромінення та цитостатику у монорежимах: деякі клітини були позбавлені цитоплазми і складалися лише з ядер та рештків мембран, ядра могли мати витягнуту або неправильну форму.

Поєднання доксорубіцину з інфрачервоним лазерним опроміненням призвело до значущих змін цитоморфологічних характеристик пухлинних клітин лінії MCF-7: у препаратах почали зустрічатися клітини дрібних розмірів, з вираженим поліморфізмом, розташуванням у невеликих скупченнях або окремо.

Навіть при поєднанні лазерного опромінення з довжиною хвилі 810 нм з доксорубіцином у дозі 0,5 мкг/мл у мікропрепараті фіксувалися дистрофічні зміни: превалювали пухлинні клітини полігональної та веретеноподібної форми з численним відростками, які утворювали сітчасту структуру, збільшилася кількість великих та гігантських клітин з гіперхромними ядрами, питома вага яких складала не менше 30 %.

Запропонована схема поєднання інфрачервоного лазерного опромінення з різними дозами доксорубіцину продемонстрував більшу ефективність протипухлинного впливу у порівнянні з групою контролю та застосуванням лазерів і доксорубіцину окремо. По-перше, спостерігалися розриви цілісних ланцюгів пухлинних клітин з утворенням мікропорожнин та наявність окремих клітин у порожнинах, по-друге сітчаста структура наростання клітин була з прорідженням, а по-третє – у деяких клітинах зустрічалися сегментовані і деформовані ядра.

Протипухлинна ефективність поєднаного застосування доксорубіцину і лазерного опромінення продемонструвала залежність як від довжини хвилі так і від дози хіміотерапевтичного препарату. Якщо червоне лазерне опромінення призводило переважно до прорідження шару пухлинних клітин з утворенням порожнин, то інфрачервоний лазер провокував розпад клітинного шару та відокремлення клітин, а також появу гігантських клітин.

Таким чином, лазерне опромінення інфрачервоного спектру у поєднанні з різними дозами доксорубіцину здатне діяти у синергії, створюючи умови для виникнення дистрофічних та деструктивних змін у чутливих до цитостатику клітинах лінії MCF-7.

3.3.2. Дослідження цитоморфологічних особливостей резистентних до цитостатиків клітин раку молочної залози людини лінії MCF-7/Dox

За даними світлооптичного дослідження клітини лінії MCF-7/Dox у групі контролю демонструвала активний ріст – поля солідних розростань та нашарування пухлинних клітин (рис. 3.9). Більшість клітин у мікропрепараті мали середні розміри, округлу або овальну форму, ядра середнього або дещо збільшеного розміру.

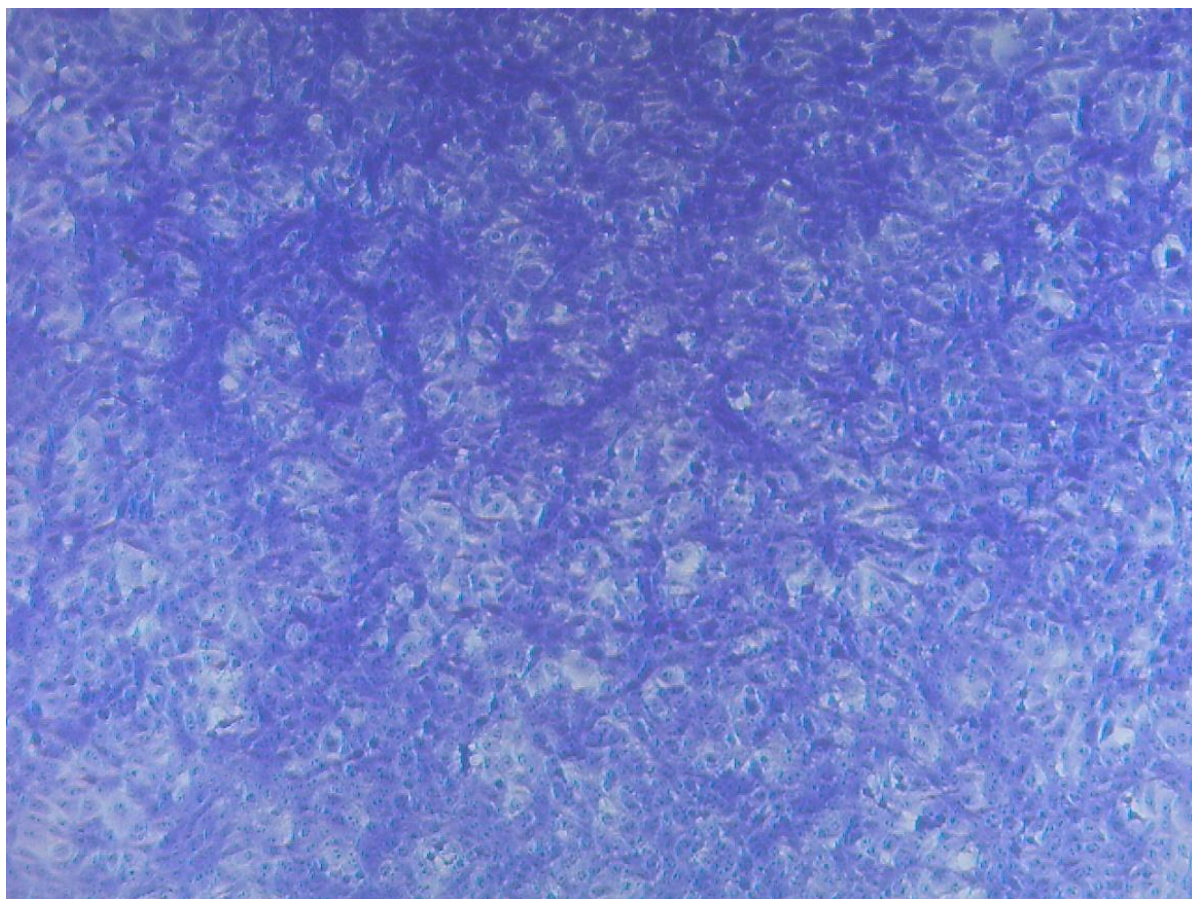


Рис.3.9. Мікрофотографія клітин MCF-7/Dox. Активний ріст, клітини розташовані суцільним пластом, з утворенням нашарувань та скупчень клітин. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

Активний ріст клітин характеризувався утворенням скупчень та нашарувань без утворення ділянок потоншення або мікропорожнин. Лише поодинокі клітини мали великі ядра, неправильну форму і різні розміри. Цитоплазма 40-50 % клітин набула інтенсивного забарвлення. У деяких клітин ядра були збільшеного розміру, а у деяких – заповнювали собою майже весь об'єм клітини.

Застосування червоного лазерного випромінювання призвело до стимуляції росту пухлинних клітин, утворення окремих груп клітин с нашаруваннями та анастомозами, появи окремих ділянок потоншення (рис. 3.10). Після впливу лазерного опромінення клітини культури MCF-7/Dox характеризувалися різноманітним ростом: у вигляді невеликих груп та скупчень або більших за чисельністю клітинних угруповань. Але загалом слід зазначити,

що пухлинні клітини у мікропрепараті, які зазнали впливу лазера, за цитоархітектонікою мало чим відрізнялися від клітин контролю.

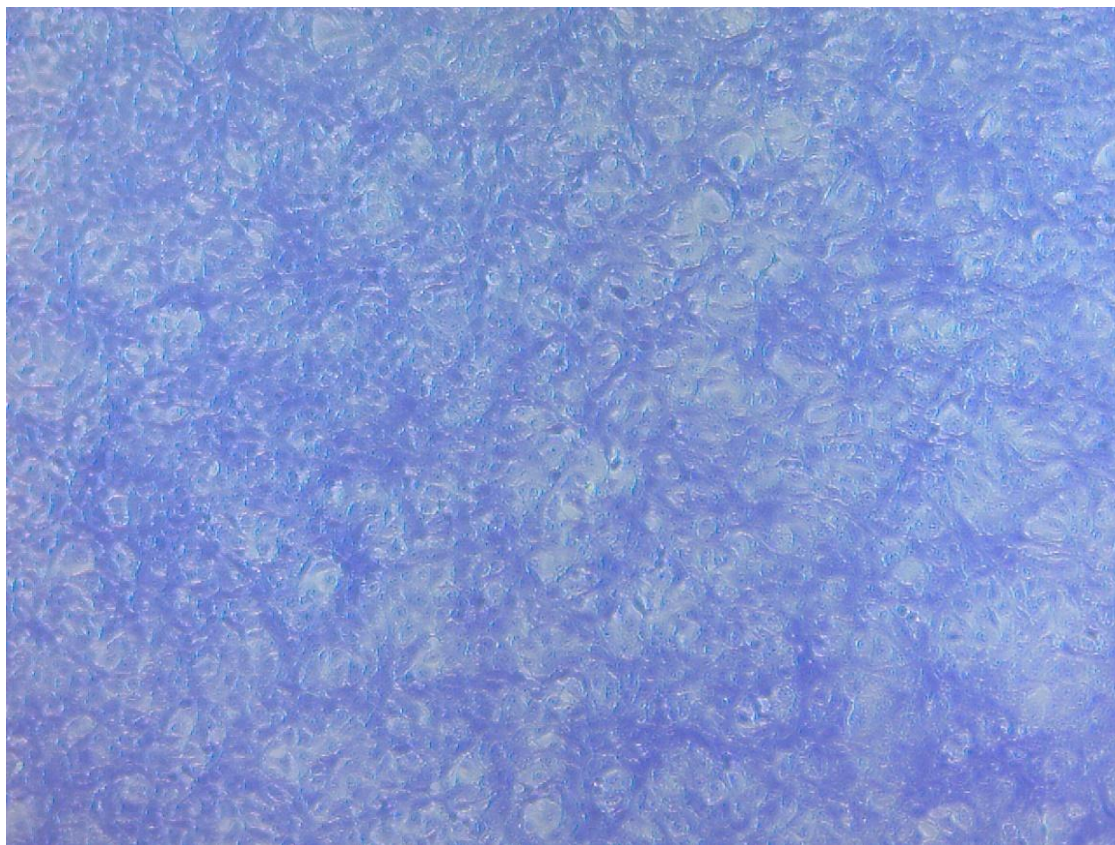


Рис.3.10. Мікрофотографія клітин MCF-7/Dox після опромінення лазером 660 нм. Активний ріст, утворення окремих груп клітин с нашаруванням та анастомозами. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

В окремих ділянках тісний зв'язок між клітинами був забезпечений появою відростків. У препараті утворилася значна кількість добре згрупованих, великих за розміром структур осередкового типу та великих площин із достатньо щільно з'єднаними між собою пухлинними клітинами.

Клітини здебільшого клітини лінії MCF7/Dox мали округлу, овальну, полігональну форму, незначний за об'ємом ободок цитоплазми та одне ядро середніх або великих розмірів. Аналогічно групі контролю відбувалась агрегація клітин в осередки різної величини та форми, в яких клітини мали щільніше розміщення.

Застосування інфрачервоного лазерного опромінення також призвело до активного росту клітин лінії MCF7/Dox з появою окремих ділянок потоншення,

але з утворенням невеликих ніш на периферії (рис.3.11). Демонструючи активний ріст, клітини були розташовані суцільним пластом, з утворенням анастомозів, нашарувань, осередків структур на кшталт симпластів. Розташовані у вигляді ланцюжків клітини наростали несиметрично, у вигляді ланцюжків або тяжів, розеток та скупчень.

Розростання пухлинних клітин було нерівномірним, вони набули забарвлення переважно середнього ступеня інтенсивності та утворили декілька шарів з окремими ділянками скупчень та нашарувань. Примітно, що не менше 50% клітин мали середні розміри з ядерно-цитоплазматичним співвідношенням на користь ядра. Близько 60 % клітин інтенсивно накопичували барвник у цитоплазмі та ядрах.

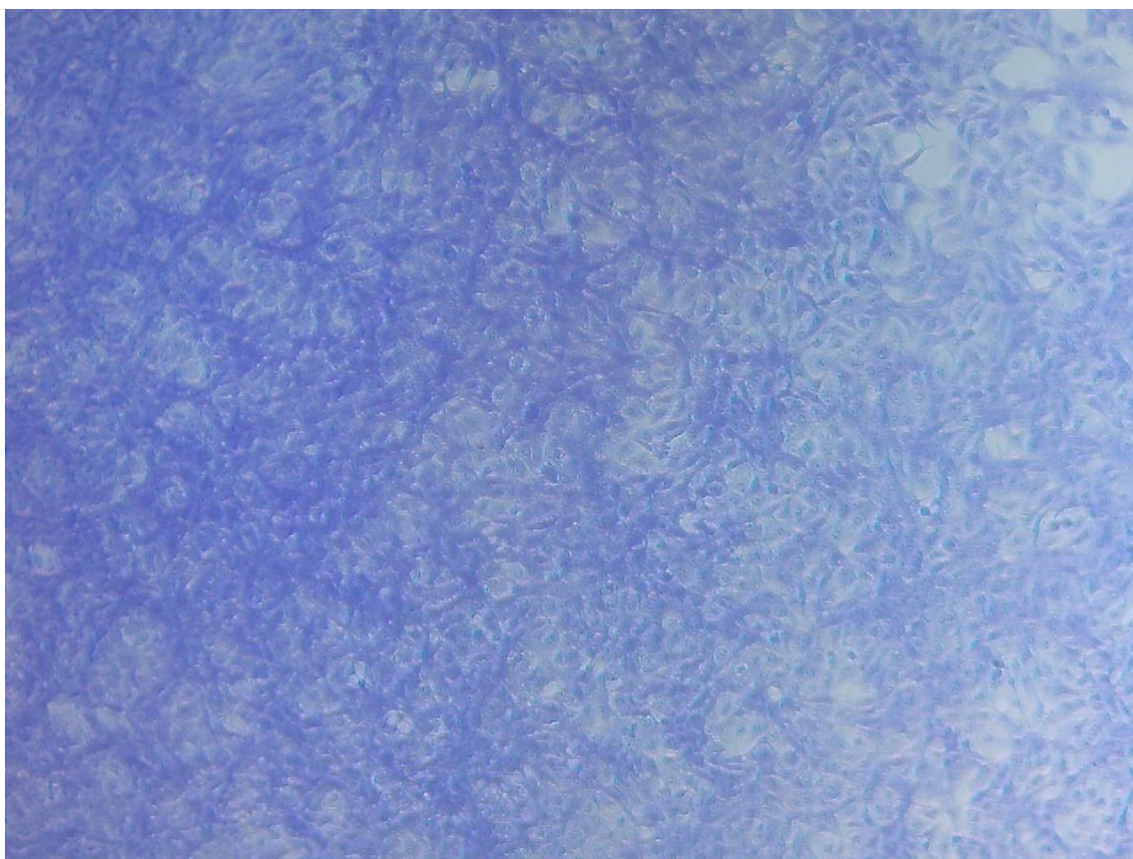


Рис.3.11. Мікрофотографія клітин MCF-7/Dox після опромінення лазером 810 нм. Активний ріст клітин, клітини розташовані суцільним пластом, утворення окремих ділянок потоншення та невеликих ніш. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

Додавання доксорубіцину у дозі 2,0 мкг/мл спричинило потоншення шару пухлинних клітин лінії MCF7/Dox по периферії. Тим не менш, приблизно 60 % клітин активно росли з утворенням нашарувань та великих скупчень. Клітини набули забарвлення середнього ступеня інтенсивності та утворили суцільний шар, у якому вони щільно прилягають одна до одної, клітини асиметричних форм та різних розмірів, багато клітин з гіперхромними ядрами, між скупченнями клітин немає порожнин (рис.3.12).

Також слід додати, що у мікропрепараті не фіксувалися ознаки вираженої дистрофії пухлинних клітин, спостерігалася поява гігантських пухлинних клітин з великими ядрами. Переважна більшість пухлинних клітин однакових середніх розмірів та містять відносно велике ексцентрично розташоване ядро. Ядра клітин середніх розмірів, округлої форми; у більшості клітин ядерно-цитоплазматичне співвідношення зсунуте в бік ядра.

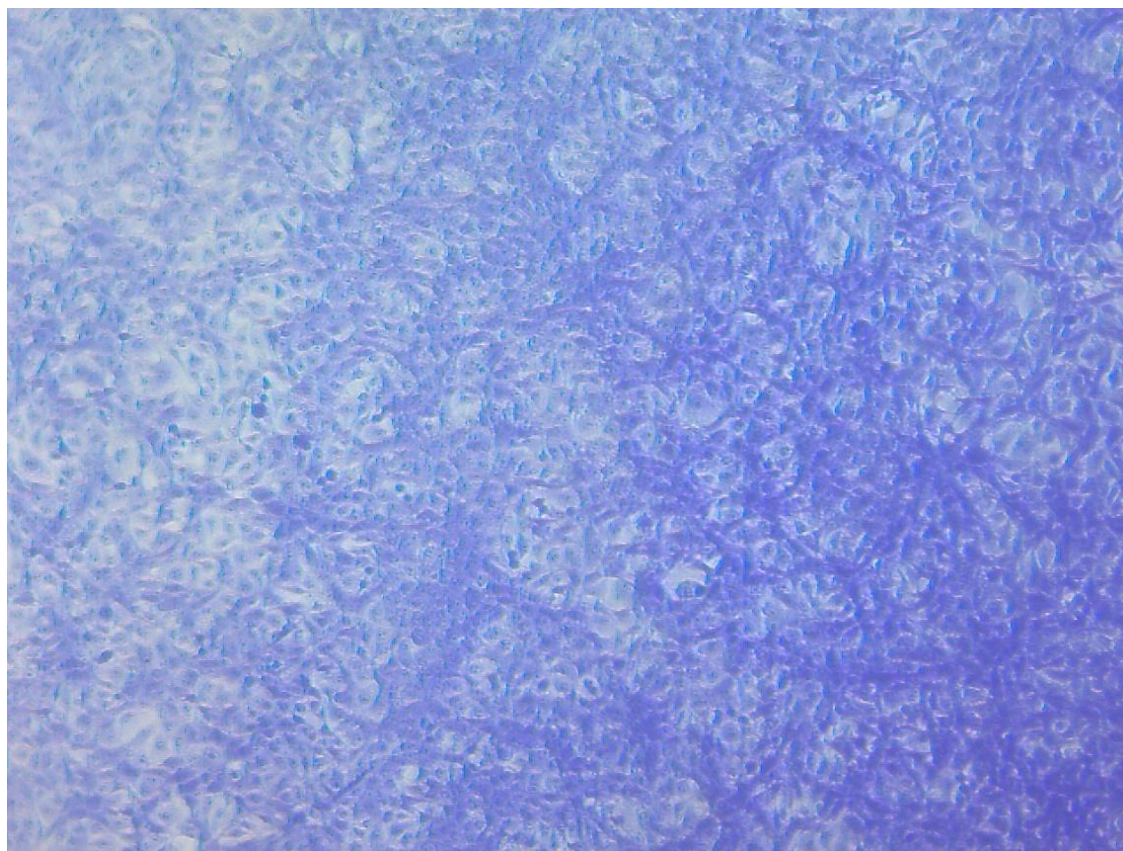


Рис.3.12. Мікрофотографія клітин MCF-7/Dox після впливу доксорубіцину (2,0 мкг/мл). Моношарове розростання пухлинних клітин з потоншенням на периферії. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

На наступному етапі дослідження до доксорубіцину у дозуванні 2,0 мкг/мл було приєднане червоне лазерне випромінювання (660 нм). Внаслідок цього відбулося розділення суцільного шару клітин, фіксувалися окремі нашарування та скупчення клітин з утворенням анастомозів та відокремлених груп клітин (рис.3.13).

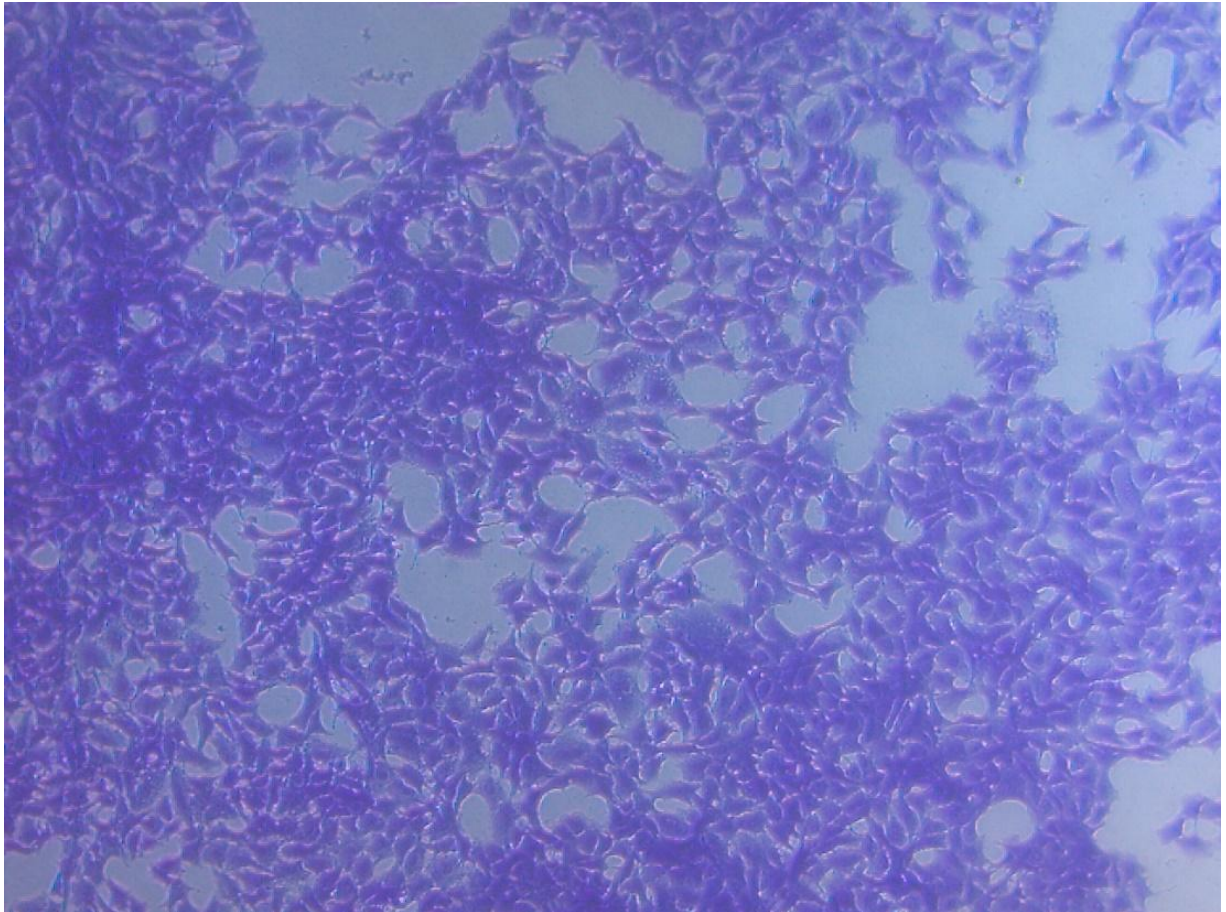


Рис.3.13. Мікрофотографія клітин MCF-7/Dox після поєднаного впливу доксорубіцину (2,0 мкг/мл) та червоного лазерного опромінення (660 нм). Розділення суцільного шару клітин, окремі нашарування та скупчення клітин з утворенням анастомозів та відокремлених груп клітин. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

Слід відзначити, що поєднаний вплив лазерного опромінення і доксорубіцину на клітини резистентної лінії призвів до утворення великих порожнин, в яких знаходилися відокремлені клітини, або роз'єднані невеличкі групи клітин. У мікропрепараті можна побачити різноманітні структури:

осередкові скупчення ракових клітин, що формують солідні ділянки росту, клітини у вигляді дрібних ланцюжків, що лежать на різній відстані один від у порожнинах. В окремих ділянках клітини середнього та невеликого розміру збираються навколо гігантських клітин з великими ядрами. Як і в культурі MCF-7, характерною рисою при розташуванні скупчень клітин в мікропрепаратах лінії MCF-7/Dox була тенденція до нашарування, яке ймовірно було наслідком їхньої конкуренції за життєвий простір. Крім того, можна відмітити появу окремих осередків гігантських клітин, які нібито домінують в оточенні клітин менших розмірів.

В протилежність цьому, при поєднанні червоного лазерного опромінення з меншою дозою доксорубіцину (0,5 мкг/мл) був відмічений активний ріст пухлинних клітин з осередками нашарувань, який був схожий на такий у групі контролю (рис.3.14).

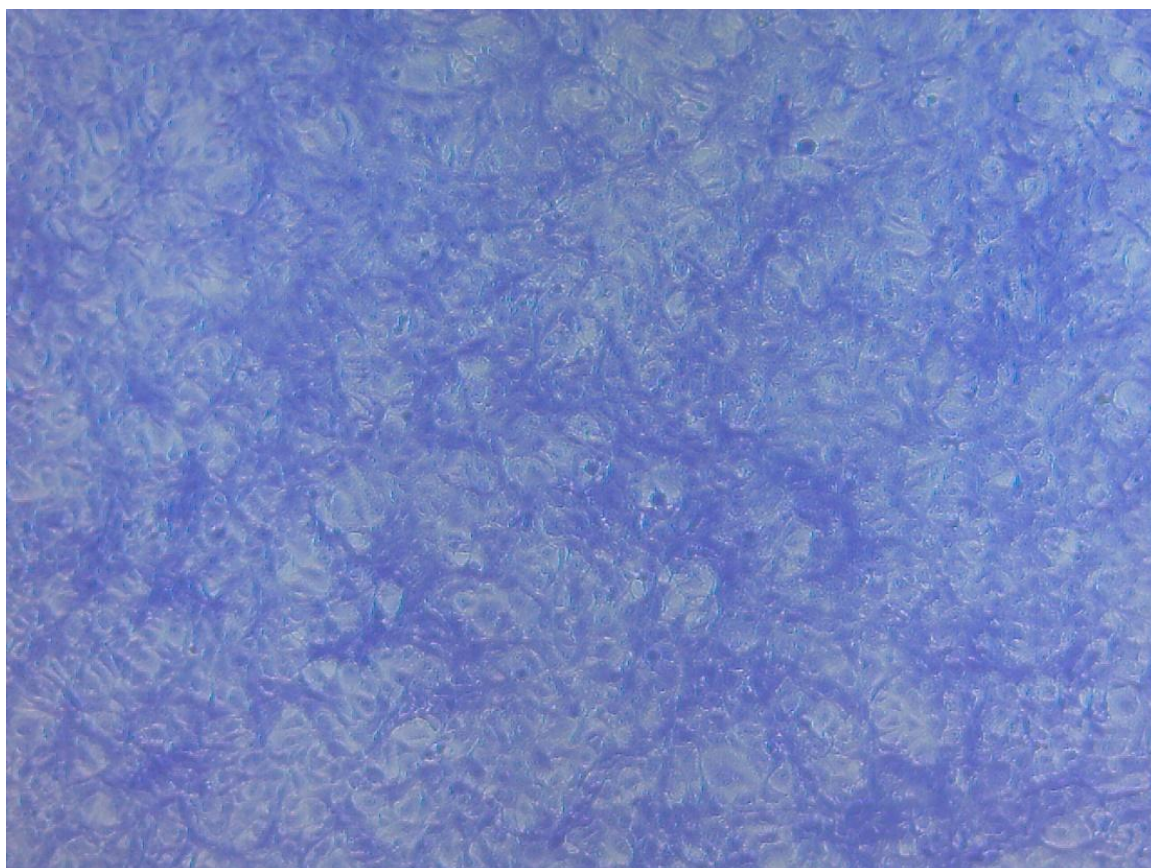


Рис.3.14. Мікрофотографія клітин MCF-7/Dox після поєднаного впливу доксорубіцину (0,5 мкг/мл) та червоного лазерного опромінення (660 нм). Активний ріст пухлинних клітин з осередками нашарувань. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

У мікропрепаратах спостерігався активний ріст пухлинних клітин, утворення окремих груп клітин с нашаруваннями та анастомозами, появи окремих ділянок потоншення. Видно значну кількість добре згрупованих, великих за розміром структур осередкового типу та великих площин із достатньо щільно з'єднаними між собою пухлинними клітинами. В окремих ділянках тісний зв'язок між клітинами був забезпечений появою відростків. Клітини здебільшого округлої форми та мають одне ядро середніх розмірів. Активний ріст клітин характеризується утворенням скупчень та нашарувань, а ділянки з утворенням розривів або порожнин відсутні.

Приєднання до доксорубіцину дії інфрачервоного лазерного опромінення продемонструвало найбільшу протипухлинну ефективність за оцінкою цитоморфологічних змін. Лазер у поєднанні з доксорубіцином в дозі 2,0 мкг/мл викликав у лінії MCF7/Dox розрив солідно зростаючих пухлинних клітин з утворенням порожнин та відділенням відокремлених груп клітин та поодиноких клітин (рис. 3.15)

Клітини, які були зафіксовані у препараті, демонстрували ознаки дистрофії та деструктивних змін, у переважної більшості клітин MCF7/Dox був відмічений виражений поліморфізм: клітини різних розмірів як неправильної, так і полігональної округлої форми були з'єднані між собою за допомогою численних відростків. Ексцентрично або периферично розташовані ядра клітин були різних розмірів — великі (20-25%), середні (65-70 %) і дрібні (5-10%), у переважної більшості клітин ядерно-цитоплазматичне співвідношення було зсунуте у бік ядра.

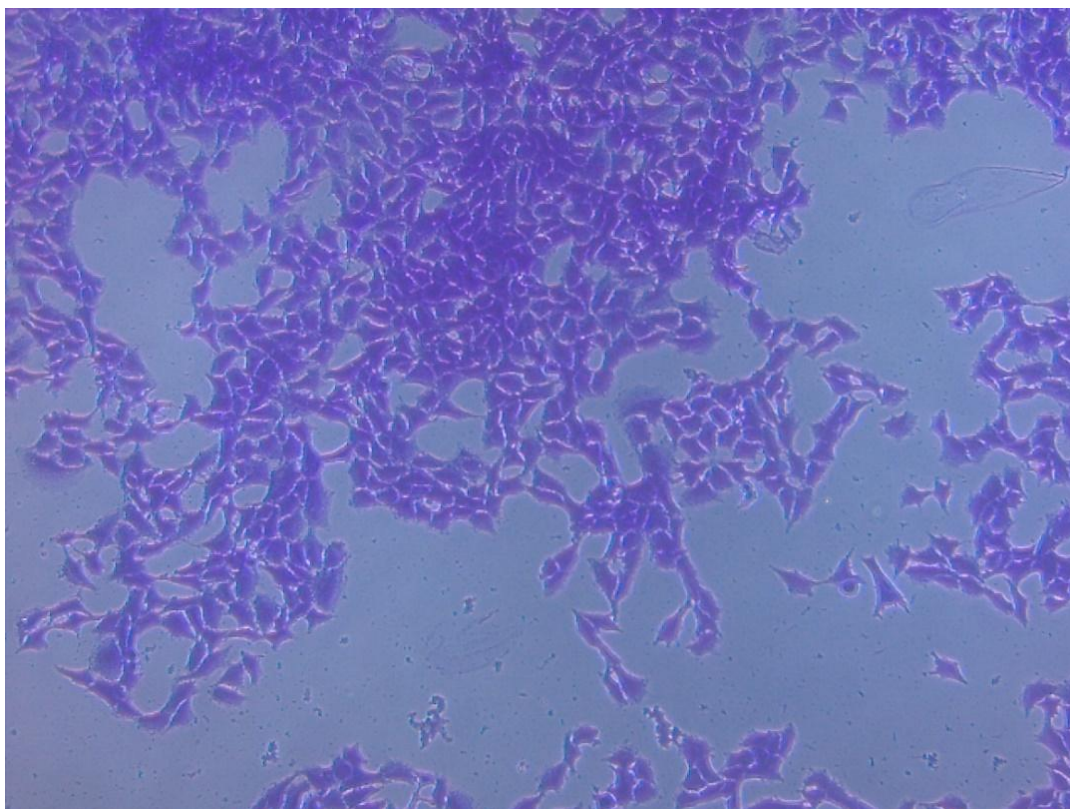


Рис.3.15. Мікрофотографія клітин MCF-7/Dox після поєднаної дії лазерного опромінення (810 нм) та доксорубіцину (2,0 мкг). Втрата зв'язків між зростаючими пухлинними клітинами з утворенням великих порожнинних структур; групи клітин і окремі клітини; клітини з розірваними мембранами і розшарованою цитоплазмою, гігантські клітини з великими ядрами. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

Вперше у мікропрепараті площа шару пухлинних клітин займала менше 50% поля зору. При цьому слід зазначити, що на межі з великими порожнинами пухлинні клітини росли з утворенням груп та окремих нашарувань, клітини утворювали анастомози за участю відростків. Також спостерігалися розриви цілісних ланцюгів пухлинних клітин з утворенням мікропорожнин та поява гігантських клітин з великими гіперхромними ядрами. Пухлинні клітини демонстрували виражений поліморфізм: вони були різних розмірів, полігональної та веретеноподібної форми з численним відростками.

Більш того, вплив інфрачервоного лазера (доза опромінення 15 Дж/см², експозиція 5 хв) у поєднанні з меншою дозою хіміопрепарату (0,5 мкг/мл) також призвело до втрати зв'язків між клітинами лінії MCF-7/Dox з утворенням

великих порожнинних структур, в яких визначалися групи клітин і окремі клітини (рис. 3.16).

У препаратах визначалися клітини різних розмірів з ознаками дистрофії та деструктивних змін, спостерігалася поява гігантських пухлинних клітин з великими ядрами. Більшість пухлинних клітин у мікропрепараті були поліморфними за розмірами — від дрібних до великих, здебільше округлої, рідше неправильної форми, найчастіше містили ексцентрично розташоване одне ядро. Ядра клітин різних розмірів — великі (55-60 %), середні (25-30 %) і дрібні (10-15 %), як правило, округлої форми, з нерівним контуром. У більшості клітин ядерно-цитоплазматичне співвідношення зсунуте в бік ядра, цитоплазма має вигляд вузької облямівки.

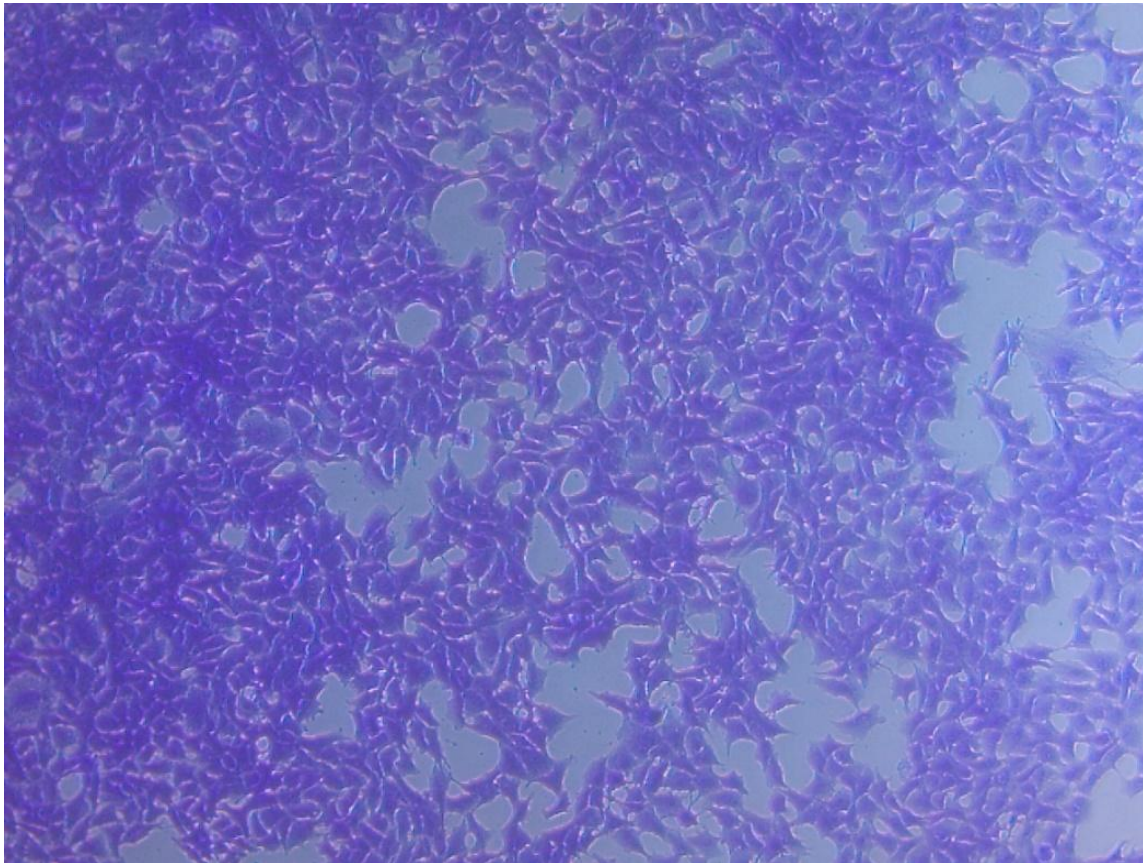


Рис.3.16. Мікрофотографія клітин MCF-7/Dox: фотобіомодуляція (810 нм) + 0,5 мкг доксорубіцину. Ділянки розрідження, що чергуються з суцільними ділянками росту пухлинних клітин; утворення порожнин і відокремлення окремих груп клітин і поодиноких клітин; гігантські клітини і деформовані клітини з пошкодженими мембранами. Зафарбування за Романовським- Гімза x200.

Порівнюючи вплив червоного та інфрачервоного лазерного випромінювання на пухлинні клітини, можна зробити висновок, що лазер з довжиною хвилі 660 нм у поєднанні з різними дозами доксорубіцину має протипухлинну ефективність, яка підтверджується наявністю дистрофічних змін перш за все у чутливій до DOX клітинній лінії.

Відмінною рисою культури MCF-7, на яку вплинуло червоне лазерне опромінення низької енергії (660 нм) у поєднанні з доксорубіцином, було моношарове розташування клітин. Окремі, навіть поодинокі ділянки нашарувань клітин зустрічалися тільки у поєднанні з появою гігантських клітин з великими ядрами. У препаратах зустрічалися клітини, які майже позбавлені цитоплазми і складаються лише нібито з ядер та мембран або їх фрагментів, а також гігантські клітини неправильної форми з гіперхромними ядрами.

Застосування опромінення інфрачервоним лазером у поєднанні з доксорубіцином у дозі 2,0 мкг/мл спричинило найбільші цитотоксичні ефекти у клітинах резистентної лінії: роз'єднання солідно зростаючих пухлинних клітин з утворенням порожнин та відділенням відокремлених груп клітин та поодиноких клітин, площа шару пухлинних клітин у мікропрепараті займала менше 50 % поля зору.

Крім того, інфрачервоне лазерне випромінювання навіть у поєднанні з меншою дозою хіміопрепарату (0,5 мкг/мл) також призвело до втрати зв'язків між пухлинними клітинами з утворенням великих порожнинних структур, в яких визначалися групи клітин і окремі клітини. У препаратах визначалися клітини різних розмірів з ознаками дистрофії та деструктивних змін, спостерігалася поява гігантських пухлинних клітин з великими ядрами.

За результатами вивчення морфологічних характеристик та особливостей росту клітин у мікропрепаратах лінії MCF-7/Dox, можна зробити висновок, що приєднання лазерного опромінення низької енергії до доксорубіцину сприяє зростанню його цитотоксичної активності.

Слід відзначити, що найбільш виражений цитотоксичний вплив на резистентні клітини культури MCF-7/Dox був спричинений приєднанням до доксорубіцину інфрачервоного лазера з довжиною хвилі 810 нм. Експеримент

продемонстрував, що саме інфрачервоне лазерне світло у поєднанні з доксорубіцином створює умови для виникнення дистрофічних та деструктивних змін у пухлинних клітинах.

Викладені у підрозділі 3.3.3 результати опубліковано у [177,178].

3.4. МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ ЛАЗЕРНОГО ОПРОМІНЕННЯ ТА ДОКСОРУБІЦИНУ НА КЛІТИНИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ З РІЗНОЮ ЧУТЛИВІСТЮ ДО ЦИТОСТАТИКІВ

3.4.1. Дослідження впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на проліферативний потенціал клітин раку молочної залози людини з різною чутливістю до цитостатиків

Відомо, що формування фенотипу медикаментозної резистентності до доксорубіцину у клітинах раку молочної залози людини супроводжується зниженням їх проліферативної активності. Враховуючи зазначене, для більш повної інформації щодо з'ясування механізмів, які лежать в основі впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на клітини РМЗ людини, нами було проведено дослідження особливостей експресії Ki-67 у клітинах ліній MCF-7 та MCF-7/Dox під дією зазначених чинників.

В результаті дослідження встановлено, що поєднане застосування лазера і DOX в обох досліджуваних концентраціях (0,5 та 2,0 мкг) призвело до відчутного зниження експресії Ki-67, як у порівнянні з контролем, так і у порівнянні з групою доксорубіцину без опромінення лазером (рис.3.17).

Як червоний (довжина хвилі 660 нм) так і інфрачервоний (810 нм) лазер спричинили зменшення рівня експресії Ki-67 у клітинах чутливої до доксорубіцину лінії при застосуванні різних доз хіміотерапевтичного чинника. Слід зазначити, що антипроліферативний вплив був більш виражений при застосуванні як червоного так і інфрачервоного лазера при концентрації доксорубіцину 2,0 мкг/мл: $126,9 \pm 2,1$ та $130,3 \pm 1,5$ балів H-Score відповідно у порівнянні з $234,5 \pm 9,6$ балів H-Score в контролі.

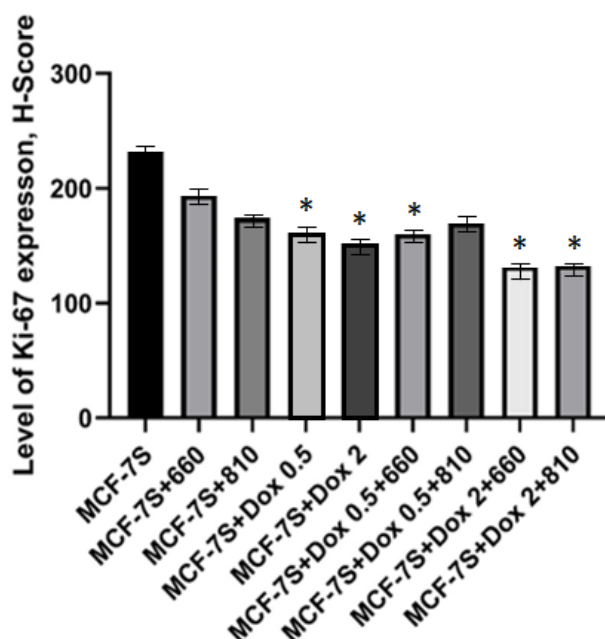


Рис.3.17. Особливості експресії Ki-67 у клітинах лінії MCF-7 під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину.

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

У резистентній до доксорубіцину культурі клітин вплив поєднаної дії лазерного опромінення різних режимів та різних доз DOX також призводило до зменшення їх проліферативного потенціалу. Слід зазначити, що вплив саме інфрачервоного світла ($\lambda 810$ нм) у поєднанні з доксорубіцином у дозі 2,0 мкг/мл призводить до пригнічення експресії Ki-67 до $175,2 \pm 5,1$ балів H-Score, що на 33,58 % менше у порівнянні з показником у групі контролю (рис. 3.18).

Підсумовуючи цей етап експериментальної роботи і беручи до уваги оцінку проліферативного потенціалу клітин, слід зазначити, що червоне (660 нм) та інфрачервоне (810 нм) лазерне опромінення реалізує свій інгібуючий вплив на клітини ліній MCF-7 та MCF7/Dox у поєднанні з різними дозами доксорубіцину.

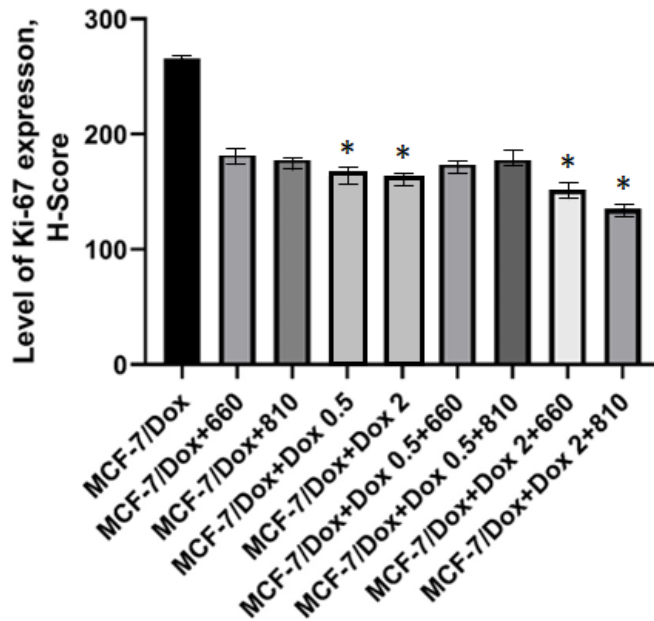


Рис.3.18. Особливості експресії Ki-67 у клітинах лінії MCF-7/Dox під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

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

Крім того, зниження експресії Ki-67 у клітинах лінії MCF-7/Dox після застосування доксорубіцину у концентрації 0,5 мкг/мл та інфрачервоного лазера свідчить про синергічну дію фотобіомодуляції та цитостатику. Найбільше зниження експресії Ki-67 зафіксовано при застосуванні доксорубіцину у концентрації 2,0 мкг/мл при поєднанні як з червоним так і з інфрачервоним лазером призводило до , особливо при застосуванні лазерного опромінення з більшою довжиною хвилі (810 нм).

Отримані дані дозволяють розглядати застосування фотобіомодуляції для підвищення цитотоксичної активності доксорубіцину як перспективний підхід до лікування злоякісних новоутворень.

3.4.2 Дослідження впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на показники експресії білків-регуляторів апоптозу у клітинах раку молочної залози людини лінії MCF-7

Згідно даних літератури та за результатами власних досліджень розвиток резистентності до цитостатиків супроводжується змінами в рівні білків-

регуляторів апоптозу. Враховуючи зазначене, на наступному етапі нами зміни експресії p53, Вах та Bcl-2 у клітинах ліній MCF-7 та MCF-7/Dox під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину.

Результати цього дослідження продемонстрували, що у групі контролю, у клітинах лінії MCF-7 (чутливих до DOX) рівень експресії p53, Вах та Bcl-2 становив $38,7 \pm 2,1$, $42,3 \pm 2,5$ та $121,3 \pm 7,6$ балів.

При застосуванні лазерного опромінення експресія p53, Вах та Bcl-2 достовірно не змінювалась (табл. 3.14) Достовірні зміни експресії Вах у клітинах лінії MCF-7 зафіксовано при застосуванні доксорубіцину у концентрації 2,0 мкг/мл та 0,5 мкг/мл. Найбільш суттєві зміни експресії p53 та Вах у клітинах чутливої лінії визначено при застосуванні лазерного опромінення та доксорубіцину (табл.3.14).

Таблиця 3.14

Особливості експресії білків-регуляторів апоптозу у клітинах лінії MCF-7 під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

	p53	Вах	Bcl-2
бали H-score			
MCF-7 (Control)	$38,7 \pm 2,1$	$42,3 \pm 2,5$	$121,3 \pm 7,6$
MCF-7 + 660	$47,3 \pm 1,5^1$	$41,0 \pm 3,6$	$113,6 \pm 10,0$
MCF-7 + DOX 0,5	$44,7 \pm 4,5^1$	$114,0 \pm 8,0^1$	$96,3 \pm 7,1^1$
MCF-7 + DOX 0,5 + 660	$54,7 \pm 8,1^{1,}$	$131,3 \pm 7,0^{1,4}$	$90,0 \pm 10,4^{1,4}$
MCF-7 + DOX 2,0	$39,3 \pm 6,0$	$175,0 \pm 3,0^1$	$76,3 \pm 1,5^1$
MCF-7 + DOX 2,0 + 660	$146,7 \pm 4,7^{1,3,4}$	$180,6 \pm 4,0^{1,4}$	$61,0 \pm 4,6^{1,3,4}$

Примітки:¹ - $p < 0.05$ порівняно із контролем (MCF-7); ² - $p < 0.05$ порівняно із MCF-7 + DOX 0,5; ³ - $p < 0.05$ порівняно із MCF-7 + DOX 2; ⁴ - $p < 0.05$ порівняно із MCF-7 + 660.

Аналогічні результати щодо зміни експресії p53 та Вах у клітинах лінії MCF-7 отримано при використанні доксорубіцину та інфрачервоного лазерного опромінення (табл.3.15)

Таблиця 3.15

Особливості експресії білків-регуляторів апоптозу у клітинах лінії MCF-7 під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

	p53	Bax	Bcl-2
бали H-score			
MCF-7 (Control)	38,7±2,1	42,3±2,5	121,3±7,6
MCF-7 + 810	52,3±3,1 ¹	78,0±3,0 ¹	105,6±5,1 ¹
MCF-7 + DOX 0,5	44,7±4,5 ¹	114,0±8,0 ¹	96,3±7,1 ¹
MCF-7 + DOX 0,5 + 810	63,3±3,5 ^{1, 2, 5}	151,3±7,0 ^{1, 2, 5}	90,7±5,6 ^{1, 5}
MCF-7 + DOX 2,0	39,3±6,0	175,0±3,0 ¹	76,3±1,5 ¹
MCF-7 + DOX 2,0 +810	165,6±6,0 ^{1, 3, 5}	187,0±8,5 ^{1, 5}	58,7±4,2 ^{1, 3, 5}

Примітки:¹ - $p < 0.05$ порівняно із контролем (MCF-7 (Control)); ² - $p < 0.05$ порівняно із MCF-7 + DOX 0,5; ³ - $p < 0.05$ порівняно із MCF-7 + DOX 2; ⁴ - $p < 0.05$ порівняно із MCF-7 + 660; ⁵ - $p < 0.05$ порівняно із MCF-7 + 810

Найбільш суттєві зміни експресії маркера Bax визначались у групі спостереження, у якій лазер застосовувався у монорежимі без додавання в клітини лінії MCF-7 доксорубіцину, а також при поєднанні інфрачервоного лазерного опромінення з різними дозами цитостатика.

3.4.3 Дослідження впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на показники клітинного циклу та експресію білків-регуляторів клітинного циклу у клітинах раку молочної залози людини лінії MCF-7

Отримані в експерименті результати вивчення розподілу клітин лінії MCF-7 за фазами клітинного циклу свідчать про модулюючу дію як доксорубіцину самостійно, так і з приєднанням червоного та інфрачервоного лазерного опромінення. Як видно з даних, наведених у табл. 3.16, кількість клітин у фазі G_0/G_1 в контролі становила 23 %, в той час як більшість клітин лінії MCF-7 перебували у S та G_2/M фазах відповідно. Під впливом

доксорубіцину кількість клітин фази у G_0/G_1 суттєво збільшилась до 49,9 %, а питома вага тих що перебувають у фазах S та G_2/M знизилася до 23,2 та 26,2 % відповідно (табл. 3.16).

Таблиця 3.16

Особливості розподілу клітин лінії MCF-7 за фазами клітинного циклу під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

ГРУПА	G_0/G_1 фаза (%)	S фаза (%)	G_2/M фаза (%)
MCF-7 (Control)	23,28±0,77	37,93±0,57	39,83±3,19
DOX 2,0	49,94±2,07 *	23,24±1,97 *	26,22±0,77 *
660	39,61±5,03 *	36,94±1,53 *	24,46±1,06 *
810	32,44±1,09 *	37,07±3,56 *	29,19±2,96 *
DOX 2,0 + 660	53,66±4,22 **	24,17±2,80 **	22,69±0,76 **
DOX 2,0 + 810	49,37±3,37 **	30,11±3,02 **	19,22±0,77 **

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX, 660 та 810

Слід зазначити, що застосування лазерів у монорежимах призвело до аналогічної тенденції розподілу – більша частина клітин перебувала у фазах G_0/G_1 та S, а менша – у фазі G_2/M . Найменшу кількість клітин у фазі G_2/M зафіксовано при поєднаному застосуванні доксорубіцину та лазерного опромінення (DOX+660 нм - 22,69±0,76 %, DOX+810нм - 19,22±0,77%) на тлі високою частки клітин лінії MCF-7 у фазі G_0/G_1 (DOX+660 нм - 53,66±4,22 %, DOX+810нм - 49,37±3,37%). Також важливо відзначити, що аналогічні тенденції до перерозподілу клітин за фазами клітинного циклу були і в групах спостереження, у яких була застосована доза доксорубіцину 0,5 мкг/мл (табл.3.17).

Таблиця 3.17

Особливості розподілу клітин лінії MCF-7 за фазами клітинного циклу під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

ГРУПА	G ₀ /G ₁ фаза (%)	S фаза (%)	G ₂ /M фаза (%)
MCF-7 (Control)	24,18±0,27	36,13±0,54	39,13±3,11
DOX 0,5	48,14±1,97 *	24,44±2,07 *	27,02±1,17 *
660	40,01±3,03 *	35,96±1,33 *	23,46±1,66 *
810	31,94±1,09 *	36,97±2,66 *	30,09±2,91 *
DOX 0,5 +660	51,66±4,02 **	25,07±2,18 **	21,89±1,07**
DOX 0,5 +810	48,33±2,34 **	31,13±2,92 **	18,44±1,47 **

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX, 660 та 810

Таким чином, аналіз клітинного циклу дозволив встановити, що використання лазерного опромінення у дозі 15 Дж/см², дозволяє модулювати цитотоксичну активність доксорубіцину, що призводить до пригнічення проліферативного потенціалу лінії MCF-7 за рахунок зниження кількості клітин у фазах G₀/G₁ та збільшення відсотку клітин у фазах S та G₂/M.

При аналізі особливостей експресії білків-регуляторів клітинного циклу з'ясовано, що під впливом доксорубіцину у лінії клітин MCF-7 відбувається зниження рівня експресії цикліну D1 до $39,9 \pm 2,29\%$ балів H-score (треба всі цифри помножити 3 і будуть бали), натомість лазерне світло у монорежимі не впливало на рівень експресії цього маркера (рис. 3.19).

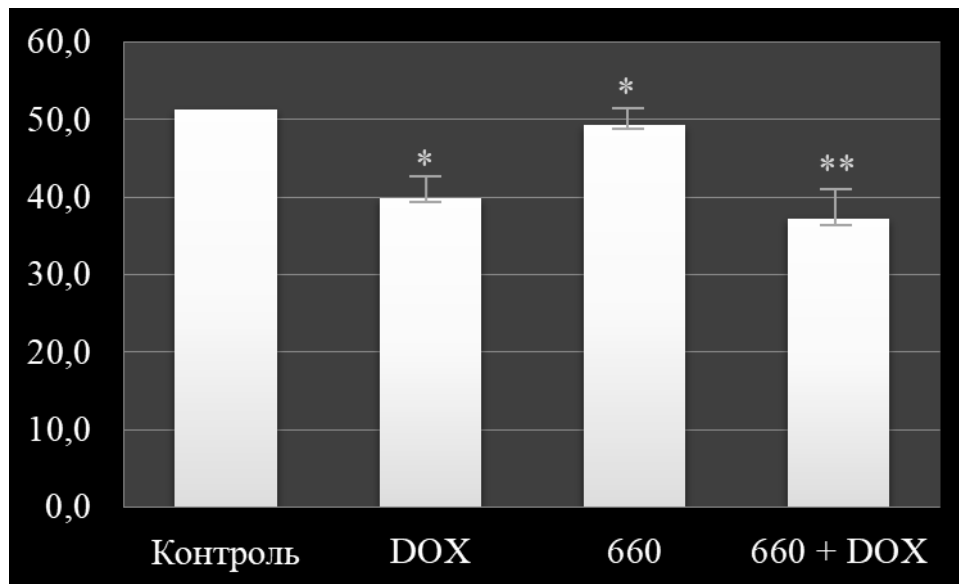


Рис. 3.19. Особливості експресії цикліну D1 у клітинах лінії MCF-7 під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX та 660

Також слід відмітити, що найбільш суттєве зниження експресії цикліну D1, спостерігалось після застосування доксорубіцину у поєднанні з лазерним опроміненням: до $37,2 \pm 2,12 \%$, що в середньому на $27,48 \%$ менше ніж у контролі.

При дослідженні експресії цикліну D1 після дії інфрачервоного лазера з довжиною хвилі 810 нм та доксорубіцину на культуру клітин MCF-7 встановлено, зниження експресії цього маркера на $22,2 \pm 3,04 \%$ та $24,6 \pm 2,88 \%$ відповідно (рис. 3.20).

Дослідження з відносно меншим дозуванням доксорубіцину (0,5 мкг/мл) продемонструвало схожі результати перерозподілу клітин за фазами клітинного циклу (рис.3.21, рис.3.22) При цьому вплив інфрачервоного лазера у монорежимі не призводив до суттєвих змін експресії цикліну D1 у лінії клітин MCF-7.

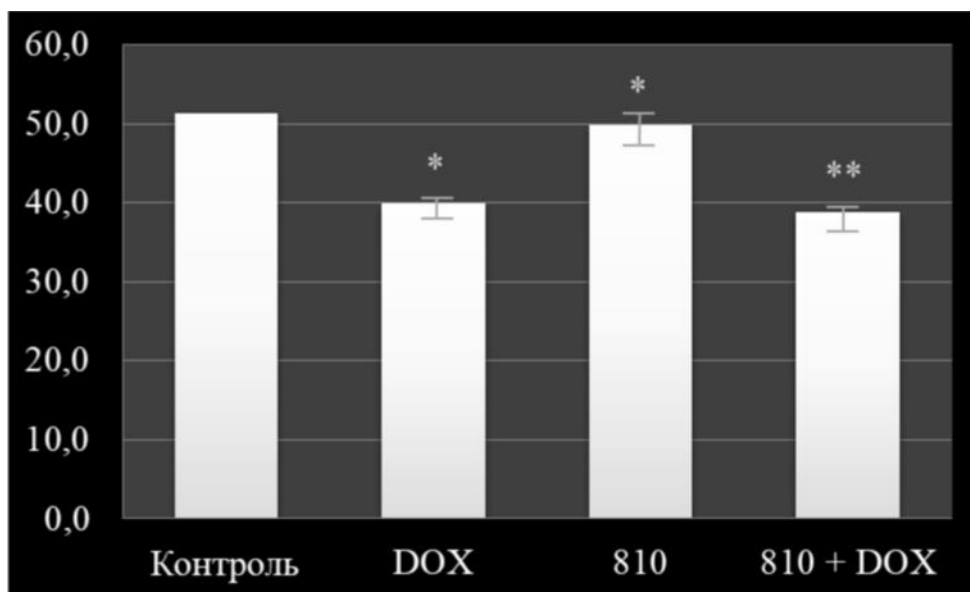


Рис.3.20. Особливості експресії цикліну D1у клітинах лінії MCF-7 під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX та 810

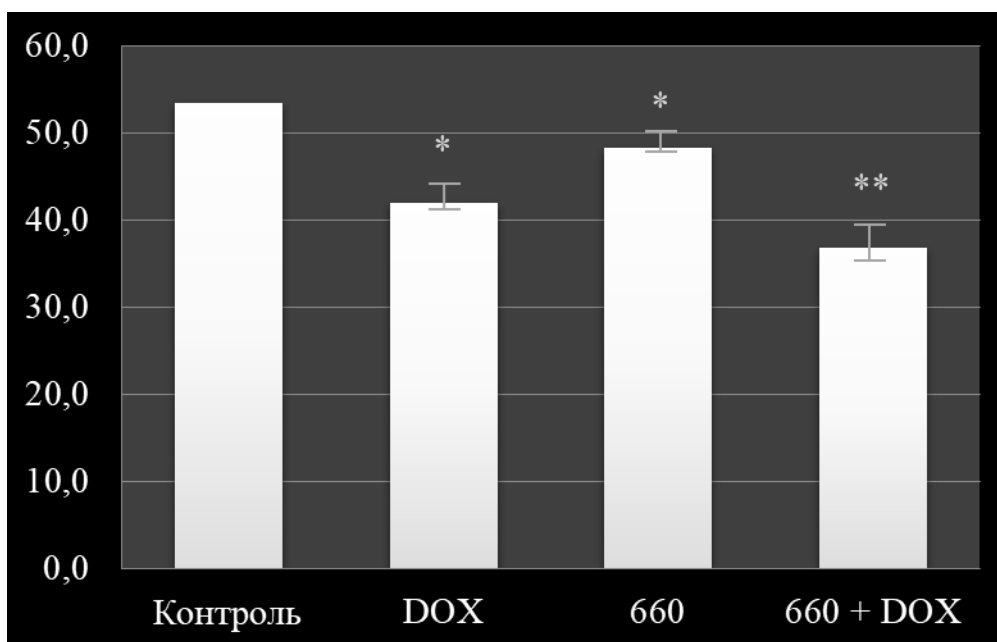


Рис.3.21. Особливості експресії цикліну D1у клітинах лінії MCF-7 під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX та 810

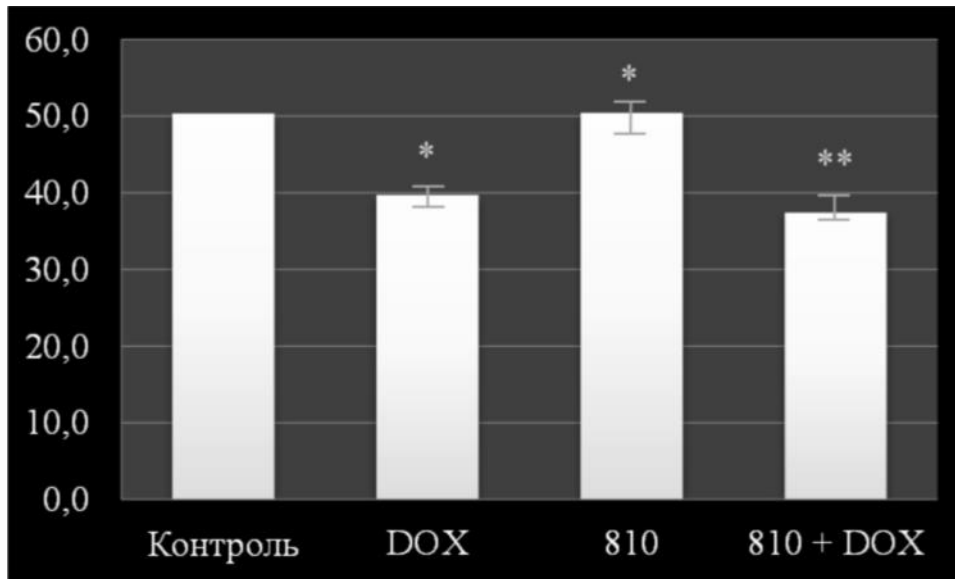


Рис.3.22. Особливості експресії цикліну D1 у клітинах лінії MCF-7 під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину.

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX та 810

При вивченні впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на клітини культури MCF7 встановлено, що у групі контролю, показник експресії регулятора клітинного циклу білка p21 був на рівні 78 балів H-Score. У свою чергу, у групі під впливом DOX експресія цього маркера зростала до $124 \pm 6,69$ балів H-Score (рис.3.23).

Застосування червоного та інфрачервоного лазера у монорежимах не призводило до суттєвих змін експресії p21. В той же час, поєднане застосування доксорубіцину в та лазера у клітинах MCF-7, спостерігалось достовірне зростання експресії цього маркера (DOX+660 нм – $116,6 \pm 3,3$; DOX+810 нм – $144,3 \pm 5,09$ балів H-Score).

Слід додати, що дослідження з відносно меншим дозуванням доксорубіцину (0,5 мкг/мл) продемонструвало аналогічну тенденцію до наростання експресії p21 у відповідь на застосування доксорубіцину і лазерного опромінення. І також, при цьому вплив інфрачервоного лазерів у монорежимах не призводив до суттєвих змін експресії зазначеного маркера (рис.3.24).

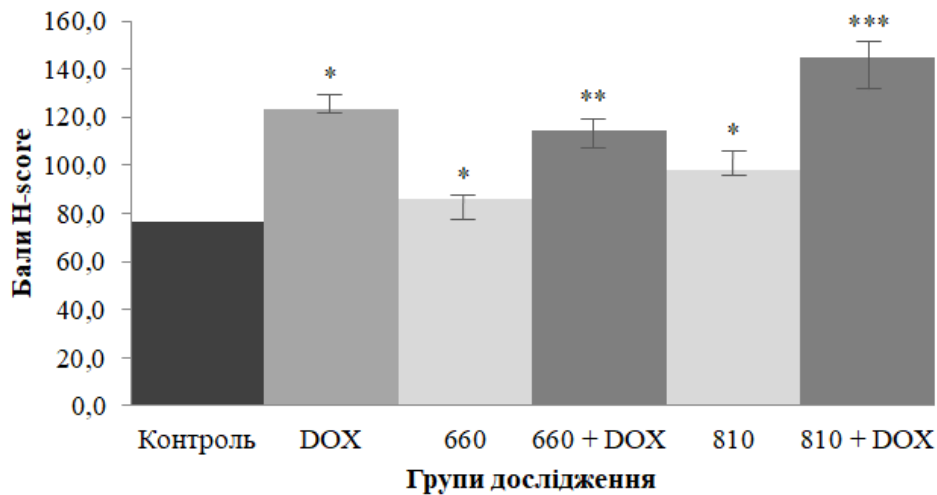


Рис.3.23. Особливості експресії p21у клітинах лінії MCF-7 під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину 660 і 810 нм та DOX.

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX, 660 та 810, *** $p < 0,01$ порівняно з 660+DOX

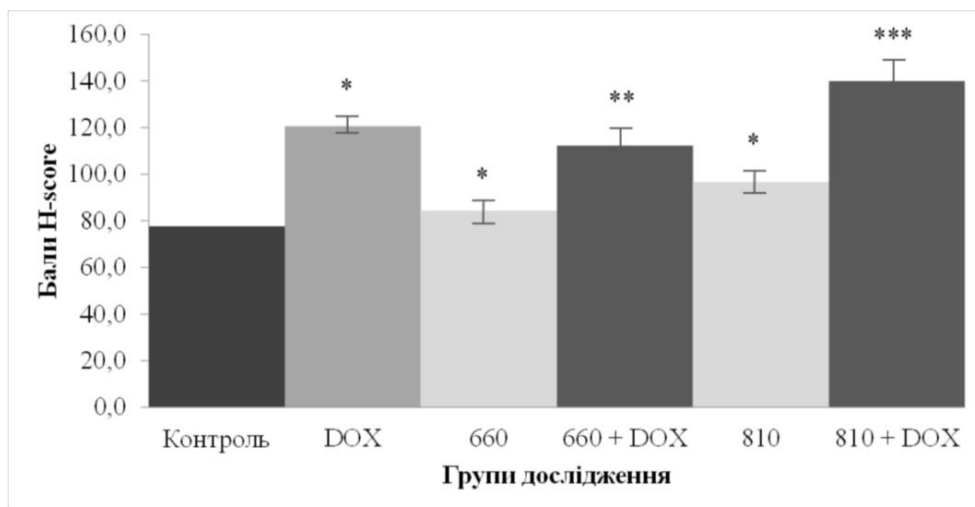


Рис.3.24. Особливості експресії p21у клітинах лінії MCF-7 під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину 660 і 810 нм та DOX.

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX, 660 та 810, *** $p < 0,01$ порівняно з 660+DOX

Беручи до уваги попередній аналіз експресії про-апоптотичних регуляторів Вах та p53 у пухлинних клітинах, можна припустити, що поєднане застосування ЛОНЕ та DOX модулює активність p21 таким чином, що цей

білок починає відігравати про-апоптотичну роль, працюючи в каскаді разом із p53 і стимулюючи вихід клітини в апоптоз.

3.4.4 Дослідження впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на показники експресії білків-регуляторів апоптозу у клітинах раку молочної залози людини лінії MCF-7/Dox

Аналіз показників експресії білків-регуляторів апоптозу у клітинах лінії MCF-7/Dox показав, що застосування доксорубіцину у концентрації 0,5 мкг/мл та лазерного опромінення у дозі 15 Дж/см² спричинило підвищення експресії Вах та p53 у клітинах лінії MCF-7/Dox: до 52,3±5,2 та 62,6±3,4 балів H-Score відповідно. Більш виражене збільшення експресії зазначених білків - регуляторів апоптозу, зокрема Вах, зафіксовано при поєднанні лазерного опромінення із доксорубіцином у концентрації 2,0 мкг/мл (табл. 3.18).

Таблиця 3.18

Особливості експресії білків-регуляторів апоптозу у клітинах лінії MCF-7/Dox під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

	p53	Вах	Bcl-2
бали H-Score			
MCF-7/Dox (Control)	35,2±3,1	30,3±4,5	185,3±7,6
MCF-7/Dox + 660	45,3±2,6 ¹	35,0±6,6	170,4±6,5
MCF-7/Dox + DOX 0,5	39,2±5,2	38,6±4,3	172,3±4,3 ¹
MCF-7/Dox + DOX 0,5 + 660	62,6±3,4 ^{1, 2, 4}	52,3±5,2 ^{1, 2, 4}	158,3±5,2 ^{1, 4}
MCF-7/Dox + DOX 2,0	55,8±4,2	62,5±3,9 ¹	145,6±4,2 ¹
MCF-7/Dox + DOX 2,0 + 660	80,7±3,7 ^{1, 3, 4}	115,4±6,1 ^{1, 3, 4}	115,2±6,6 ^{1, 3, 4}

Примітки: ¹ - p<0.05 порівняно із контролем (MCF-7/Dox (Control)); ² - p<0.05 порівняно із MCF-7/Dox + DOX 0,5; ³ - p<0.05 порівняно із MCF-7/Dox + DOX 2; ⁴ - p<0.05 порівняно із MCF-7 + 660

Отримані результати свідчать, що саме тоді, коли лазерне опромінення приєднується до доксорубіцину у відносно меншій концентрації, в культурі

клітин виникають умови для наростання експресії p53 у порівнянні з впливом хіміотерапевтичного чинника без застосування лазера.

У резистентній культурі клітин (MCF7/Dox) поєднаний вплив лазера з довжиною хвилі 810 нм та доксорубіцину у низькій дозі (0,5 мкг/мл) призводив до підвищення експресії біорегуляторів апоптозу Вах та p53 до рівня $70,1 \pm 3,6$ балів H-Score та $77,2 \pm 5,2$ балів H-Score відповідно, що вдвічі перевищує показники в групі контролю (табл. 3.19)

Таблиця 3.19

Особливості експресії білків-регуляторів апоптозу у клітинах лінії MCF-7/Dox під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

	p53	Вах	Bcl-2
бали H-Score			
MCF-7/Dox (Control)	$35,2 \pm 3,1$	$30,3 \pm 4,5$	$185,3 \pm 7,6$
MCF-7/Dox + 810	$47,4 \pm 4,1^1$	$42,3 \pm 4,1^1$	$166,3 \pm 5,1^1$
MCF-7/Dox + DOX 0,5	$39,2 \pm 5,2$	$38,6 \pm 4,3$	$172,3 \pm 4,3^1$
MCF-7/Dox + DOX 0,5 + 810	$70,1 \pm 3,6^{1,2,5}$	$77,2 \pm 5,2^{1,2,5}$	$145,3 \pm 3,5^{1,2,5}$
MCF-7/Dox + DOX 2,0	$55,8 \pm 4,2$	$62,5 \pm 3,9^1$	$145,6 \pm 4,2^1$
MCF-7/ DOX + DOX 2,0 + 810	$92,3 \pm 5,0^{1,3,5}$	$130,0 \pm 5,4^{1,3,5}$	$93,7 \pm 5,2^{1,3,5}$

Примітки: ¹ - $p < 0.05$ порівняно із контролем (MCF-7/Dox (Control)); ² - $p < 0.05$ порівняно із MCF-7/Dox + DOX 0,5; ³ - $p < 0.05$ порівняно із MCF-7/Dox + DOX 2; ⁴ - $p < 0.05$ порівняно із MCF-7 + 660; ⁵ - $p < 0.05$ порівняно із MCF-7 + 810

Отримані дані свідчать, що вплив інфрачервоного лазерного світла та різних доз доксорубіцину на культуру MCF-7/Dox може призвести до апоптозу пухлинних клітин, що підтверджується експресією відповідних маркерів. Також можна стверджувати, що зміни експресії маркерів p53 та Вах є результатом поєднаного впливу DOX та опромінення інфрачервоним лазером. Зростання рівня білків- регуляторів апоптозу в резистентній до DOX культурі аденокарциноми молочної залози після поєднаного впливу лазера з довжиною хвилі 810 нм і доксорубіцину в концентрації 0,5 мкг/мл – це результати, які

дозволяють обґрунтовано припустити, що лазерне випромінювання створює сприятливі умови для ефективної протипухлинної дії доксорубіцину у порівняно меншій концентрації.

3.4.5 Дослідження впливу лазерного опромінення та доксорубіцину на показники клітинного циклу та експресію білків-регуляторів клітинного циклу у клітинах раку молочної залози людини лінії MCF7/Dox

Як і у чутливій культурі MCF-7, у резистентній до доксорубіцину клітинній лінії також відбувся перерозподіл за фазами клітинного циклу у порівнянні з контрольною групою дослідження. Отримані дані демонструють, що застосування лазерів із довжиною хвилі 660 та 810 нм у монорежимах призвело до зниження кількості клітин у фазах S та G_2/M та зростання – у фазі G_0/G_1 . Аналогічна тенденція спостерігалася також і після монотерапії доксорубіцином: якщо у контролі було $19,94 \pm 0,76$ % клітин у G_0/G_1 фазі, а решта – у фазах S та G_2/M , то після дії DOX у всіх трьох фазах перебувала приблизно однакова кількість клітин: $38,24 \pm 2,07$ % у G_0/G_1 , $32,94 \pm 4,17$ % у S-фазі та $31,19 \pm 0,44$ % у G_2/M (табл. 3.20).

Таблиця 3.20

Особливості розподілу клітин лінії за фазами клітинного циклу під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

ГРУПА	G_0/G_1 фаза (%)	S фаза (%)	G_2/M фаза (%)
КОНТРОЛЬ	$19,94 \pm 0,76$	$40,03 \pm 0,44$	$38,02 \pm 0,44$
DOX 2,0	$38,24 \pm 2,07$ *	$32,94 \pm 4,17$ *	$31,19 \pm 0,44$ *
660	$37,11 \pm 1,07$ *	$34,14 \pm 2,55$ *	$28,88 \pm 3,13$ *
810	$30,18 \pm 4,43$ *	$37,77 \pm 1,05$ *	$31,89 \pm 1,07$ *
DOX+660	$39,82 \pm 1,08$ **	$34,11 \pm 3,11$	$25,09 \pm 1,06$ **
DOX+810	$43,44 \pm 1,04$ **	$32,16 \pm 3,14$ **	$24,44 \pm 3,31$ **

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX, 660 та 810

При вивченні поєднаного впливу доксорубіцину і лазерного опромінення червоного та інфрачервоного спектру встановлено, що такий вплив призводить до перерозподілу кількості клітин у різних фазах клітинного циклу. Якщо у контролі майже 20 % клітин знаходилися у фазі G_0/G_1 , а решта були порівну розподілені у фазах S та G_2/M , то після застосування лазерів та DOX більшість клітин (DOX+660 нм – $39,82 \pm 1,08$ %, DOX+810 нм – $43,44 \pm 1,04$ %) були вже у фазі G_0/G_1 , а відносно найменша їх частка у фазі G_2/M .

У табл.3.21 наведені дані щодо розподілу клітин MCF-7/Dox після застосування відносно меншого дозування доксорубіцину (0,5 мкг/мл), які свідчать про те, що найменшу кількість клітин у фазі G_2/M зафіксовано при поєднаному застосуванні доксорубіцину та лазерного опромінення на тлі високої частки клітин у фазі G_0/G_1 (табл.3.21)

Таблиця 3.21

Особливості розподілу клітин лінії за фазами клітинного циклу під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

ГРУПА	G_0/G_1 фаза (%)	S фаза (%)	G_2/M фаза (%)
КОНТРОЛЬ	$19,94 \pm 0,76$	$40,03 \pm 0,44$	$38,02 \pm 0,44$
DOX 0,5	$38,24 \pm 2,07$ *	$32,94 \pm 4,17$ *	$31,19 \pm 0,44$ *
660	$37,11 \pm 1,07$ *	$34,14 \pm 2,55$ *	$28,88 \pm 3,13$ *
810	$30,18 \pm 4,43$ *	$37,77 \pm 1,05$ *	$31,89 \pm 1,07$ *
DOX+660	$39,82 \pm 1,08$ **	$34,11 \pm 3,11$	$25,09 \pm 1,06$ **
DOX+810	$43,44 \pm 1,04$ **	$32,16 \pm 3,14$ **	$24,44 \pm 3,31$ **

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX, 660 та 810

Підсумовуючи даний етап експериментальних досліджень, можна зробити висновок, що застосування лазерного опромінення низької енергії, особливо з довжиною хвилі 810 нм (15 Дж/см^2), дозволяє підвищити

цитотоксичну активність доксорубіцину за рахунок блокування клітинного циклу та інгібіції проліферації клітин лінії MCF-7/Dox.

Зафіксований після застосування DOX і лазерів перерозподіл клітин, більшість яких знаходяться у фазі клітинного циклу G_0/G_1 може свідчити про можливу модуляцію циклінових білків, зокрема цикліну D1, який є ключовим регулятором переходу клітини у фазу S.

Найбільш суттєві зміни показників експресії цикліну D1 зафіксовано клітинній лінії MCF7/Dox після поєднаного застосування червоного лазерного опромінення (660 нм) і доксорубіцину (рис.3.25).

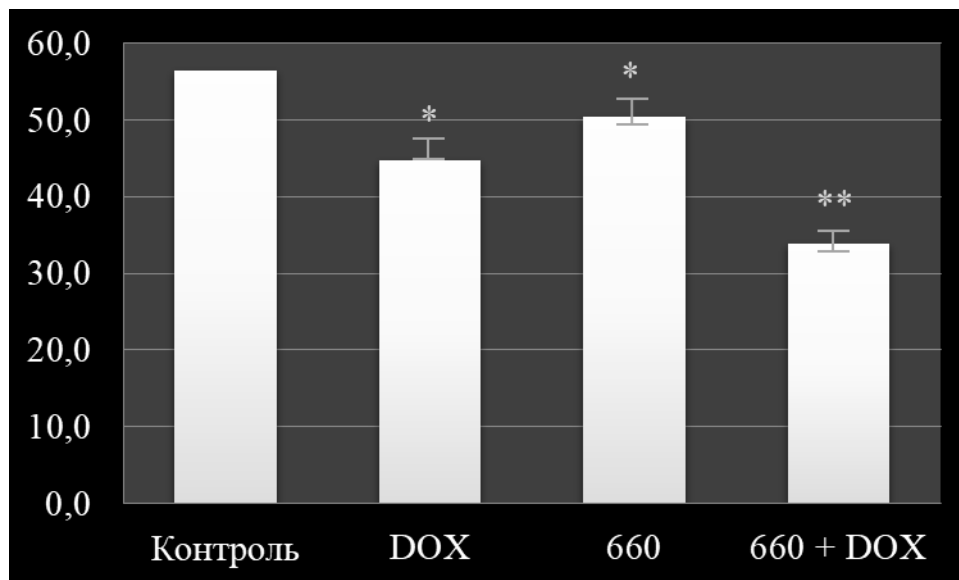


Рис.3.25 Особливості експресії цикліну D1у клітинах лінії MCF-7/Dox під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX та 660

Якщо у групі дослідження «660 + DOX» питома вага пухлинних клітин, які експресують циклін D1, становила в середньому $33,9 \pm 1,94\%$, то у групах «DOX» та «660» $44,7 \pm 2,04\%$ і $50,4,8 \pm 1,08\%$ відповідно.

Схожа тенденція прослідковується при дослідженні резистентної лінії MCF7/Dox після застосуванні інфрачервоного лазерного випромінювання (810 нм), коли було зафіксоване достовірне зменшення питомої ваги експресуючих клітин на $31,38 \pm 3,13\%$ у порівнянні з контролем. При цьому

застосування лазерного опромінення без доксорубіцину було не достатньо для помітного впливу на експресію цикліну D1 (рис. 3.26).

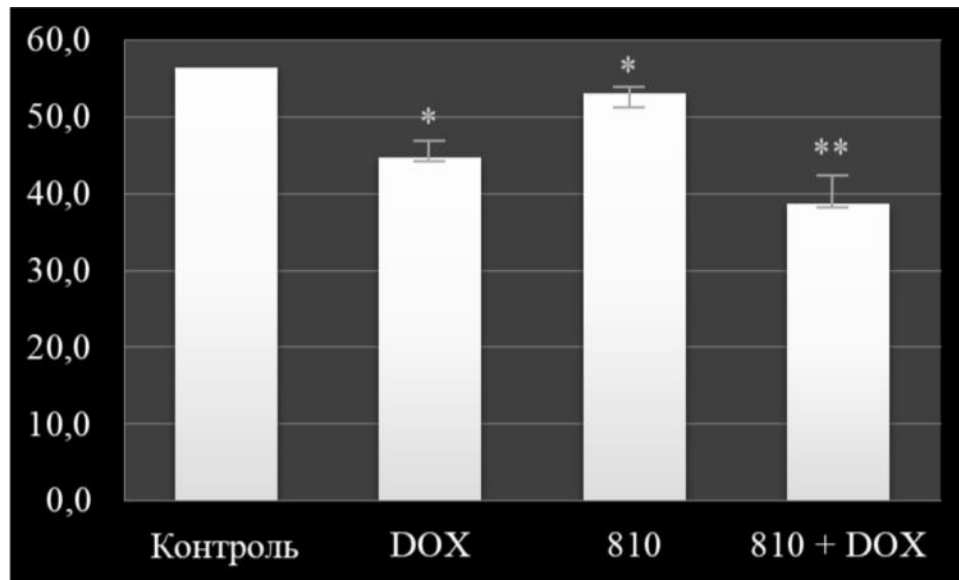


Рис.3.26. Особливості експресії цикліну D1у клітинах лінії MCF-7/DOX під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX та 810

Червоне лазерне випромінювання продемонструвало найбільш вагомий вплив на експресію цикліну навіть при застосування меншої дози доксорубіцину: показник H-Score знизився до 34,4 балів, що на 40,4% нижче ніж показник у контрольній групі (рис.3.27); а інфрачервоний лазер обумовив зниження експресії цикліну до 37,8 балів H-Score, що нижче за контроль на 28,9% (рис.3.28).

Отримані дані свідчать, що застосування інфрачервоного лазерного опромінення у поєднанні з доксорубіцином здатне модулювати експресію цикліну, який залучений у процеси регуляції клітинного циклу.

Зменшення експресії дослідженого маркеру саме у групі «810 + DOX» дозволяє обгрунтовано припустити, що інфрачервоний лазер діє з хіміотерапевтичним агентом у синергії.

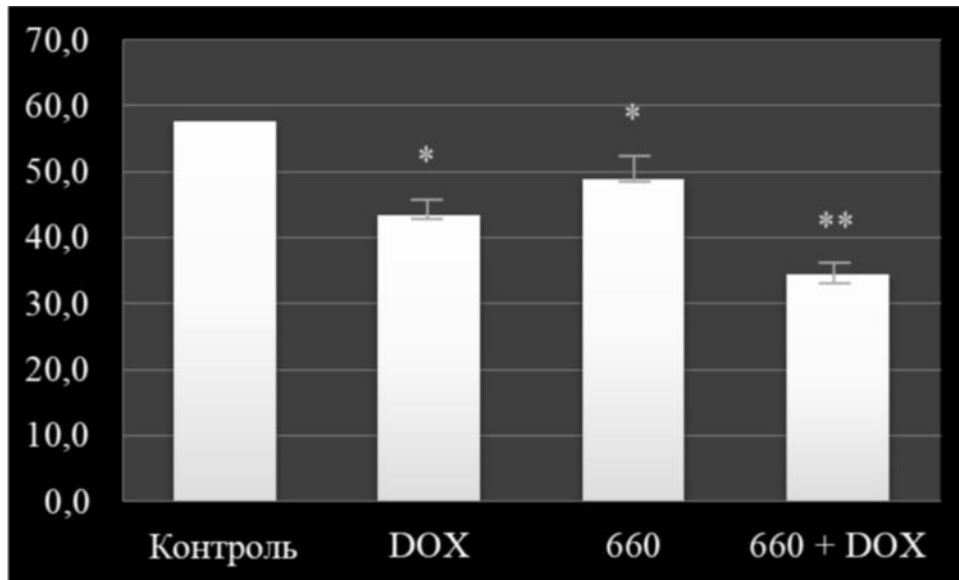


Рис.3.27. Особливості експресії цикліну D1у клітинах лінії MCF-7/DOX під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX та 810

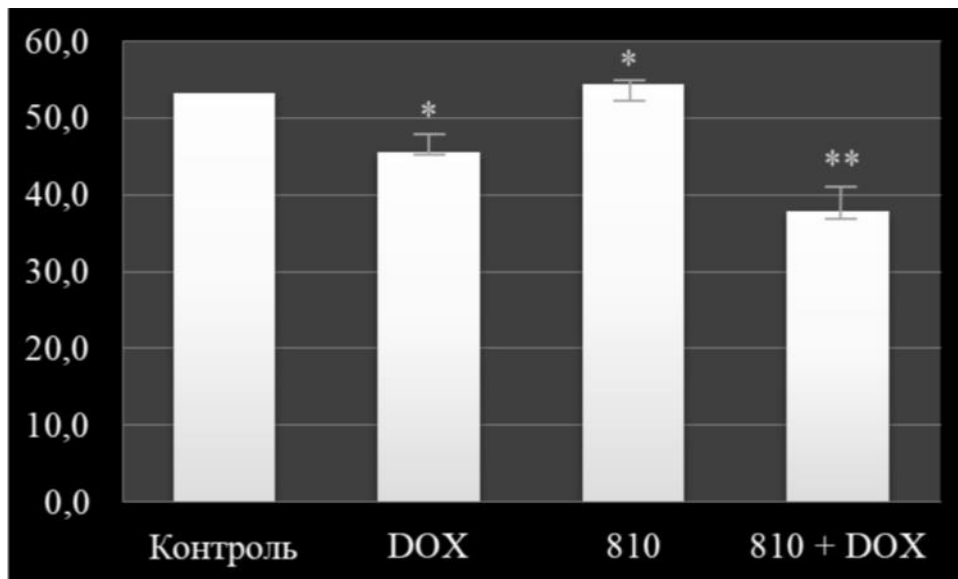


Рис.3.28. Особливості експресії цикліну D1у клітинах лінії MCF-7/DOX під впливом лазерного опромінення та доксорубіцину

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX та 810

Порівнюючи отримані показники з групою контролю, можна зробити висновок, що саме поєднання лазера та хіміотерапевтичного чинника

спричиняє у резистентних пухлинних клітинах помітну дерегуляцію експресії цикліну D1.

При вивченні показників експресії p21 у клітинах резистентної культури встановлено, що у групі контролю експресія цього регулятора клітинного циклу була на рівні 80 балів H-Score. При застосуванні лазерів у монорежимах суттєвих змін експресії p21 не виявлено. Під впливом доксорубіцину та опромінення лазером з довжиною хвилі 660 нм зафіксовано більш виражену, ніж у групі контролю, експресію показника, яка дорівнювала $115 \pm 3,06$ балів та $116,4 \pm 2,02$ балів H-Score відповідно (рис. 3.29)

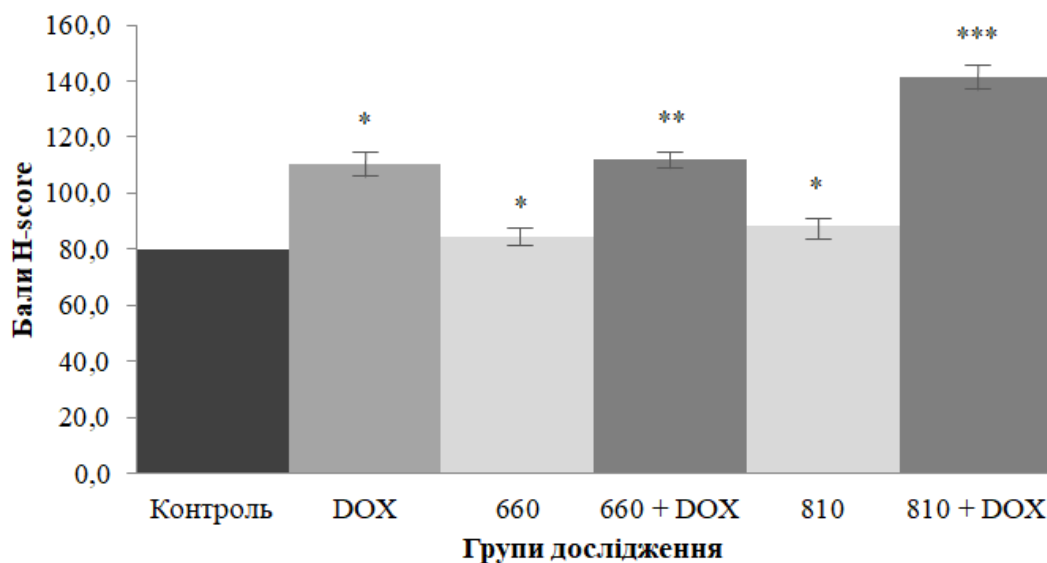


Рис.3.29. Порівняння рівня експресії p21 у культурі MCF-7/Dox у відповідь на вплив лазерного опромінення 660 і 810 нм та DOX.

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX, 660 та 810, *** $p < 0,01$ порівняно з 660+DOX

Застосування інфрачервоного лазерного випромінювання у поєднанні доксорубіцином викликало суттєве підвищення експресії p21 у клітинах MCF7/Dox: до $141,2 \pm 4,14$ балів H-Score. Цей результат представляється важливим, адже показник експресії у групі «810+ DOX» на 32,75% вищий за такий у групі «DOX» та на 76,5% більший ніж у групі контролю.

Також слід додати, що навіть відносно низька концентрація доксорубіцину (0,5 мкг/мл) призводила до значущих змін у експресії p21:

підвищення до 149,1 балів H-Score, що вище за контроль на 81,4% і головне – вище за такий показник у групі доксорубіцину без опромінення на 37,0% (рис.3.30).

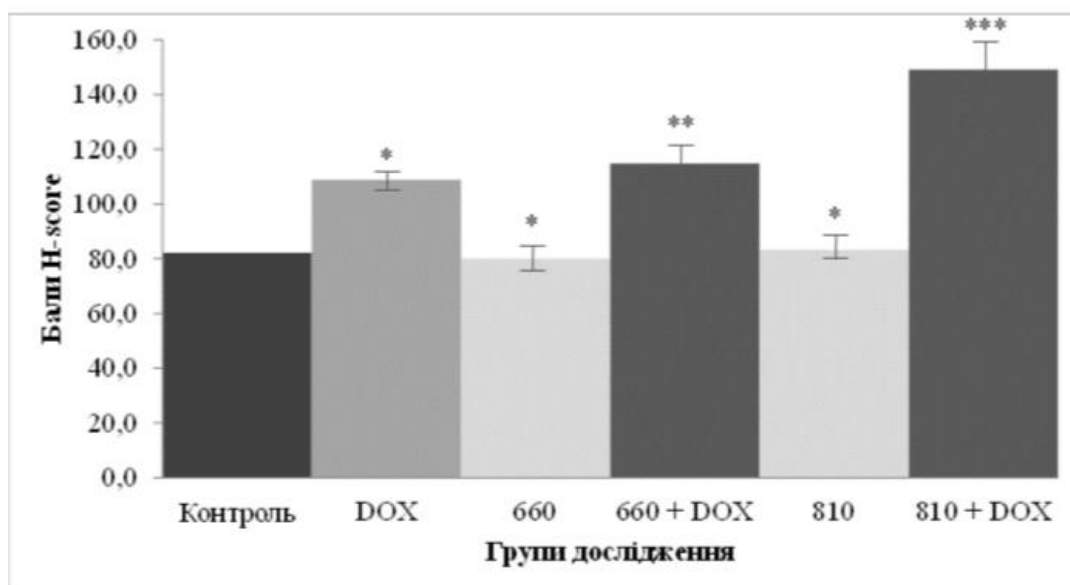


Рис.3.30. Порівняння рівня експресії p21 у культурі MCF-7/Dox у відповідь на вплив лазерного опромінення 660 і 810 нм та DOX.

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з групами DOX, 660 та 810, *** $p < 0,01$ порівняно з 660+DOX

Підсумовуючи проведений етап експериментальної роботи, можна зробити висновок, що лазерне випромінювання у поєднанні з доксорубіцином здатне впливати на біологічну поведінку пухлинних клітин, створюючи умови для перерозподілу клітин за фазами клітинного циклу і модулюючи активність цикліну D1 та p21. Отримані результати відкривають можливості для розробки нових підходів до підвищення протипухлинної активності доксорубіцину і подолання резистентності пухлинних клітин до дії цього цитостатика.

Викладені у підрозділах 3.4.1 - 3.4.5 результати опубліковано у [178,179].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Сучасні лазерні технології надали потужного поштовху розвитку лікувальних стратегій з використанням енергії світла, включаючи фотодинамічну терапію (ФДТ) і фотобіомодуляцію (ФБМ). Ефективність застосування лазерів було підтверджено у багатьох доклінічних та клінічних дослідженнях. Комбінація фототерапії та хіміотерапії, за ретельного спланування, заявила себе ефективним варіантом лікування пухлин як у доклінічних, так і у клінічних дослідженнях. Значний внесок у розвиток напрямку фотомедицини зробили українські вчені Інституту експериментальної патології, онкології і радіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, зокрема дослідницька група на чолі з М.Ф. Гамалією, розробки та наукові роботи якої визнані у всьому світі [5,9]. Її монографія “Lasers in Experiment and Clinic” стала основою для подальших успішних робіт в галузі фотобіології та фотомедицини.

У даний час продовжуються успішні випробування застосування лазерів у комбінації з хіміотерапевтичними засобами, моноклональними антитілами, пептидами та іншими сполуками. Доведено, що фотодинамічна терапія у поєднанні з хіміотерапією потенційно може забезпечити більш ефективне системне лікування онкологічного хворого. Таке комбіноване лікування визнано клінічно виправданим і продемонструвало посилену протипухлинну ефективність у порівнянні з лазерами або хіміотерапією [15-17]. Цитостатики можуть викликати окислювальний стрес, генеруючи гідроксильні радикали, яких при поєднанні з ФДТ/ФБМ за рахунок квантового збудження його молекул може бути достатньо для зупинки клітинного циклу та подальшої загибелі пухлинних клітин. Тому можна було обґрунтовано передбачити, що при певних параметрах опромінення і при певних концентраціях доксорубіцину буде виникати момент, з якого у пухлинних клітинах запускатиметься каскад біологічних реакцій, які призведуть до незворотних змін.

Крім того, представляється важливою здатність ФБМ здійснювати фототоксичні ефекти без генотоксичного чи мутагенного впливу, що призводить до загибелі злоякісно трансформованих клітин шляхом аутофагії та апоптозу за рахунок збільшення активності АФК. [21].

На сьогодні поки що не достатньо досліджено не тільки алгоритми застосування лазерів низької енергії як самостійних факторів впливу на пухлинні клітини, але й також залишається відкритим питання щодо можливого потенціалу застосування інфрачервоного лазерного випромінювання для підсилення ефективності та покращення переносимості хіміотерапії і для подолання резистентності [30].

Метою представленої дисертаційної роботи було дослідити механізми дії лазерного опромінення на клітини раку молочної залози людини з різною чутливістю до цитостатиків в модельній системі *in vitro* та обґрунтувати можливість його використання для підвищення цитотоксичної активності доксорубіцину та подолання фенотипу медикаментозної резистентності.

Відповідно до мети роботи було поставлено такі завдання: вивчити цитотоксичну активність та визначити оптимальні режими застосування червоного та інфрачервоного лазерного випромінювання на чутливих і резистентних до DOX клітинних лініях MCF-7 та MCF-7/Dox; дослідити модифікуючий вплив червоного та інфрачервоного лазерного випромінювання на цитотоксичну активність DOX у клітинних лініях MCF-7 та MCF-7/Dox; проаналізувати цитоморфологічні особливості клітин MCF-7 та MCF-7/Dox внаслідок дії DOX за умов приєднання лазерного випромінювання; охарактеризувати зміни клітинного циклу та білків, що беруть участь в його регуляції, у чутливих та резистентних клітинах ліній MCF-7 та MCF-7/Dox під впливом лазерного випромінювання та DOX; з'ясувати особливості експресії білків-регуляторів апоптозу у чутливих та резистентних клітинах PM3 після дії лазерів та DOX; обґрунтувати перспективи використання лазерного випромінювання для підвищення цитотоксичної активності DOX та подолання медикаментозної резистентності.

Підбір режимів опромінення та доз цитостатика для клітин MCF-7 та MCF-7/Dox, з огляду на дані світової літератури останніх років [18,38,46,50,55, 77,79,81,83], а також власні напрацювання, проводився з метою визначення порогових параметрів, на які відбувається відгук культур РМЗ та які б можна було використовувати у подальших дослідках, поєднуючи дію червоного та інфрачервоного лазера з доксорубіцином.

Дослідження показало, що чутливі до DOX клітини демонструють різні пороги реактивності при застосуванні лазерного опромінення. При дії червоного лазера з довжиною хвилі 660 нм відмічалася помітна ефективність впливу навіть впродовж короткого терміну опромінення із застосуванням дози 10 Дж/см². В свою чергу, інфрачервоний лазер із довжиною хвилі 810 нм не спричиняв значущого ефекту доки доза опромінення не була збільшена до 15 Дж/см². Із збільшенням експозиції до 5 хвилин спотерігався помітний цитотоксичний вплив інфрачервоного лазера, про що свідчить показник виживаності пухлинних клітин на 16,6 % менше у порівнянні з контролем

У свою чергу, при підборі режимів опромінення клітин, резистентних до доксорубіцину, отримані результати були принципово іншими.

Значущий і стабільний цитотоксичний ефект починав фіксуватися лише при дозуванні 10 Дж/см², а максимальний цитотоксичний вплив - при наростанні дози опромінення до 15 Дж/см². Серія експериментів продемонструвала, що лазерне випромінювання як червоного так і інфрачервоного спектру чинить відмінний та різноспрямований вплив на виживаність клітин MCF-7 та MCF-7/Dox. Було встановлено, що клітини MCF-7 є також більш чутливими і до дії лазера, а MCF-7/Dox – навпаки менш чутливі. При впливі на клітини MCF-7/Dox значущий і стабільний цитотоксичний ефект починав вперше фіксуватися лише при дозуванні 10 Дж/см² та при досягненні терміну експозиції у 7 хвилин показник виживаності був на 13 % менше у порівнянні з контролем. Слід відзначити, що інфрачервоне лазерне світло для виникнення цитотоксичного ефекту потребувало збільшення дози до 15 Дж/см² та часу опромінення не менше 5 хвилин. Отримані параметри були використані у подальших експериментах.

Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури, щодо дії різних параметрів лазерного випромінювання та його здатності впливати на пухлинні клітини, ініціюючи в них зворотні або незворотні зміни.

У деяких дослідженнях доведено, що вплив лазерного світла на мітохондрії викликає збільшення продукції активних форм кисню, що у нормальній неушкодженій клітині може слугувати передумовою для більш активної діяльності та покращення здатності до відновлення [39,41,175,176]. І навпаки, у злоякісній клітині, у якій синтез АФК може бути початково більш інтенсивним, лазер здатний провокувати надмірне вивільнення АФК і яє наслідок – призводити до критичного дисбалансу окисно-відновних процесів, які потенційно ведуть до апоптозу [44, 45, 177-179]. Також можна додати, що лазерне випромінювання здатне створювати умови для посилення протипухлинної імунної відповіді [175,180].

З метою підбору доз доксорубіцину для подальших дослідів була використана оцінка виживаності клітин ліній MCF-7 та MCF-7/Dox та застосовані різні дозування DOX. Результати дослідження показали, що відносно низькі дози DOX (0,5 та 1,0 мкг/мл) призводили до досягнення цитотоксичних ефектів у чутливій до цитостатика культурі РМЗ людини, при чому використання DOX у концентрації 1,0 мкг/мл вже намітило тенденцію до досягнення показника IC30. Концентрації DOX (2,0 та 3,0 мкг/мл) призвели до ще більш вираженого зниження показників виживаності пухлинних клітин, що відповідало IC30 та IC50.

У свою чергу, резистентна до DOX культура на застосування доксорубіцину у дозуванні 0,5 мкг/мл та 1,0 мкг/мл не реагувала, тенденція до досягнення IC30 проявилася лише при дозуванні 2,0 мкг/мл та 3,0 мкг/мл, а рівня ефективності IC50 так і не вдалося досягти. Отримані результати дозволили оцінити дози у 0,5 мкг/мл та 2,0 мкг/мл як порогові значення протипухлинного діапазону DOX, тому вони були використані у подальших експериментах.

При вивченні показників виживаності клітин MCF7 та MCF-7/Dox після впливу лазерного випромінювання у поєднанні з різними дозами DOX слід

було враховувати той факт, що DOX є хромофором і потенційним фотосенсибілізатором (ФС). І якщо у більшості джерел світової літератури оприлюднено вивчення ефективності хіміотерапії на основі DOX в поєднанні з додатковими ФС [89,90], то окремі роботи розкривають потенціал фотосенсибілізуючих властивостей власне DOX. Встановлено, що після фотоактивації DOX у злоякісно трансформованих клітинах спостерігалось світлозалежне утворення АФК і підвищення цитотоксичної ефективності цього цитостатика [91].

Підтверджуючи окремі дані світових досліджень, власний дослід показав, що цитотоксичні ефекти доксорубіцину у клітинних лініях MCF-7 проявлявся по-різному: якщо інфрачервоний лазер (810 нм) спрацював у поєднанні з цитостатиком спорадично, в деяких випадках навіть зменшуючи цитостатичну дію DOX, а найбільша протипухлинна ефективність фіксувалась при максимальній дозі опромінення, то червоне лазерне світло (660 нм) у комбінації з різними концентраціями DOX (0,5 та 2,0 мкг/мл) демонструвало лінійну залежність від доз та термінів опромінення. Встановлено, що лазерне світло низької енергії здатне при визначених параметрах діяти як фактор, який покращує цитотоксичну активність доксорубіцину: досягнення IC30 та IC50 зафіксоване при дозуваннях 0,5 мкг/мл та 2,0 мкг/мл відповідно, чого не відмічалось при аналогічній концентрації DOX без застосування лазера.

Вивчення впливу лазерів на резистентну культуру MCF-7/Dox продемонструвало, що завдяки приєднанню інфрачервоного лазерного опромінення зростає ефективність хіміотерапевтичного препарату: зафіксована цитотоксична ефективність на рівні IC50. Такого результату не вдавалось досягти у групах дослідження в культурі MCF-7/Dox без застосування лазерного опромінення. Отримані дані говорять про те, що ЛОНЕ створює умови для подолання резистентності пухлинних клітин до DOX.

При вивченні впливу лазерів на проліферативний потенціал клітин РМЗ встановлено, що як червоний (довжина хвилі 660 нм) так і інфрачервоний (810 нм) лазери спричинили зменшення рівня експресії регулятора проліферації Ki-67 в чутливій до DOX клітинній лінії при застосуванні різних доз

хіміотерапевтичного чинника. Антипроліферативна дія була більш вираженою при концентрації DOX 2,0 мкг/мл: при поєднанні з червоним лазером експресія Ki-67 була на рівні $126,9 \pm 2,1$ балів H-Score, а при поєднанні з інфрачервоним $130,3 \pm 1,5$ балів H-Score, що на 44 % менше за показник у контролі – $234,5 \pm 9,6$ балів H-Score. У резистентній до DOX клітинній лінії MCF-7/Dox вплив поєднаної дії лазерного опромінення різних режимів та різних доз DOX також призвів до зменшення проліферативного потенціалу. Але слід зазначити, що вплив саме інфрачервоного світла ($\lambda 810$ нм) у поєднанні з хіміотерапевтичним чинником у дозі 2,0 мкг/мл викликав пригнічення експресії Ki-67 до рівня $175,2 \pm 5,1$ балів H-Score, що на 33 % менше за показник у групі контролю. Крім того, тенденція до зниження експресії Ki-67 у клітинах MCF-7/Dox після застосування меншої дози цитостатика (0,5 мкг/мл) та інфрачервоного лазера свідчить про синергічну дію фотобіомодуляції та DOX.

Отримані дані дозволили розглядати застосування різних доз доксорубіцину у поєднанні з фотобіомодуляцією як перспективну терапевтичну методику впливу на пухлинні клітини для ініціації в них процесів апоптозу, а також як спосіб зниження токсичних ефектів хіміотерапії за рахунок зменшення доз DOX при збереженні його цитотоксичної активності.

При дослідженні експресії маркерів апоптозу в культурі MCF-7 нами встановлено, що у порівнянні з контролем, в групах, де було поєднано експозицію з DOX та дію лазерів, спостерігалось суттєве підвищення експресії білків p53 та Bax. Якщо у контролі експресія p53 була зафіксована на рівні $38,7 \pm 2,1$ балів H-Score, то при приєднанні DOX (0,5 мкг/мл) та лазеру з довжиною хвилі 660 нм цей показник p53 зростав до $54,7 \pm 8,1$ балів H-Score. Поєднане застосування червоного лазера та DOX у концентрації 2,0 мкг/мл призводило до збільшення 73% експресії цього маркера порівняно з контролем. Більш того, ці показники були значно більшими за аналогічні значення у групі контролю, але й у порівнянні з застосуванням DOX без лазерного опромінення та лазера у монорежимі: DOX окремо як у концентрації 0,5 мкг/мл так і 2,0 мкг/мл не викликав значущого зростання експресії p53: показник був на

рівні $44,7 \pm 4,5$ та $39,3 \pm 6,0$ балів H-Score відповідно. Лазер у монорежимі призвів до незначного підвищення експресії p53 до $47,3 \pm 1,5$ балів H-Score.

У контрольних клітинах лінії MCF-7 експресія Вах складала $42,3 \pm 2,5$ балів H-Score. Під впливом DOX в дозі $0,5$ мкг/мл та червоного лазера активність Вах зросла до $131,3 \pm 7,0$ балів H-Score, що на 67 % більше за показник контролю, а поєднання дії лазерного опромінення з DOX у концентрації $2,0$ мкг/мл призвело до збільшення показника експресії Вах до $180,6 \pm 4,0$ балів H-Score, що перевищувало контрольний показник на 76%. Затосування лазерного опромінення та дозволило підсилити цитотоксичну активність DOX та призвело до підвищення експресії проапоптичного білка Вах:, зокрема при концентрації $0,5$ мкг/мл – експресія сягала $131,3 \pm 7,0$ балів H-Score, що було більше на 13 % у порівнянні з контролем.

Підвищення показників експресії маркерів апоптозу в культурі MCF-7 при приєднанні лазерного опромінення до дії DOX надає підстави говорити про те, що лазерне опромінення відіграє роль фактора, який може стати вирішальним у подоланні резистентності пухлинних клітин до цитостатиків.

Цікавими представляються результати вивчення рівня експресії анти-апоптичного регулятора Bcl2 у клітинах PM3, чутливих до DOX. Якщо у групі контролю експресія Bcl2 була зафіксована на рівні $121,3 \pm 7,6$ балів H-Score, то після дії доксорубіцину ($0,5$ мкг/мл) та лазера з довжиною хвилі 660 нм експресія p53 знизилась на 25 % (до $90,0 \pm 10,4$ балів H-Score), що менше. Поєднане застосування червоного лазера до DOX у концентрації $2,0$ мкг/мл епризводило до зниження експресії дослідженого білка-регулятора апоптозу на 49 % (до $61,0 \pm 4,6$ балів H-Score), що порівняно з контролем

При застосуванні інфрачервоного лазерного опромінення у поєднанні з доксорубіцином також зафіксовано про-апоптичний ефект по відношенню до клітин раку молочної залози лінії MCF-7. У порівнянні з контролем, в групах, де було використано поєднану експозицію DOX та дію лазера з довжиною хвилі 810 нм, спостерігалось суттєве підвищення експресії в p53 та Вах. При поєднанні DOX ($0,5$ мкг/мл) та інфрачервоного лазера експресія p53 зросла до $63,3 \pm 3,5$ балів H-Score. А при приєднанні червоного лазера до DOX у

концентрації 2,0 мкг/мл експресія дослідженого маркера зросла на 77 % (до $165,6 \pm 6,0$ балів H-Score)., що у порівнянні з групою контролю. Також слід зазначити, що ці показники були значно більшими не тільки за такі у групі контролю, але й у порівнянні з застосуванням DOX без лазерного опромінення.

Аналогічна тенденція прослідковувалася при вивченні експресії Вах. Якщо у групі контролю експресія цього маркера дорівнювала $42,3 \pm 2,5$ балів H-Score, то після дії DOX в дозі 0,5 мкг/мл та червоного лазера його експресія зросла на 72 % (до $151,3 \pm 7,0$ балів H-Score); а поєднання дії лазерного опромінення з DOX у дозі 2,0 мкг/мл призвело до зростання показника експресії Вах до $187,0 \pm 8,5$ балів H-Score, що було більше за показник контролю на 77 %. Таким чином, приєднання лазерного опромінення до DOX посилило про-апоптотичну дію хіміопрепарату, зокрема при дозуванні 0,5 мкг/мл – експресія Вах зафіксована на рівні $151,3 \pm 7,0$ балів H-Score. У порівнянні з застосуванням DOX окремо (експресія Вах на рівні $114,0 \pm 8,0$ балів H-Score) це більше на 24 %.

Застосування інфрачервоного лазерного випромінювання для підвищення цитотоксичної активності DOX також призводило до змін експресії у клітинах лінії MCF-7. Якщо у групі контролю показник експресії Bcl2 становив $121,3 \pm 7,6$ балів H-Score, то під впливом доксорубіцину у концентрації 0,5 мкг/мл та лазера з довжиною хвилі 810 нм експресія Bcl2 знизилась на 25 % (до $90,7 \pm 5,6$ балів H-Score). А при приєднанні інфрачервоного лазера до DOX у дозі 2,0 мкг/мл експресія маркера була вже на рівні $58,7 \pm 4,2$ балів H-Score, що на 52 % менше порівняно з контролем. Примітно, що до таких значущих зрушень не призвело застосування лазера у монорежимі або DOX окремо.

При вивченні поєданого впливу лазерного опромінення і доксорубіцину на резистентну культуру MCF-7/Dox, також зафіксоване підвищення експресії білків-регуляторів Вах та p53. Важливо акцентувати, що такий ефект спостерігався при використанні обох концентрацій DOX: 2,0 мкг/мл та 0,5 мкг/мл. Якщо у контролі експресія p53 дорівнювала $35,2 \pm 3,1$ балів H-Score, то після дії DOX (0,5 мкг/мл) та лазера з довжиною хвилі 660 нм експресія цього маркера зросла до $62,6 \pm 3,4$ балів H-Score. В той час як приєднанні

червоного лазера до DOX у дозі 2,0 мкг/мл, рівень p53 збільшувався до $80,7 \pm 3,7$ балів H-Score, що на 128 % вище порівняно з контролем. Також, цей показник був вищим у порівнянні з застосуванням DOX без лазерного опромінення та лазера у монорежимі. Доксوروبіцин окремо у концентрації 2,0 мкг/мл вивкликав підвищення рівня p53 до $55,8 \pm 4,2$ балів H-Score. Інфрачервоний лазер у монорежимі призвів до незначного у порівнянні з іншими групами дослідження зростання експресії маркера до $45,3 \pm 2,6$ балів H-Score. У контрольних клітинах лінії MCF-7/Dox експресія Вах становила $30,3 \pm 4,5$ балів H-Score. Застосування DOX в концентрації 0,5 мкг/мл та червоного лазера призвело до зростання рівня Вах на 73 % (до $52,3 \pm 5,2$ балів H-Score), а поєднання дії лазерного опромінення з DOX у дозі 2,0 мкг/мл призвело до зростання показника експресії Вах до $115,4 \pm 6,1$ балів H-Score, що більше за контрольний показник на 283%. Можна констатувати, що приєднання лазерного опромінення до DOX посилює про-апоптотичну дію останнього, зокрема при дозуванні 0,5 мкг/мл – експресія Вах зафіксована на рівні $52,3 \pm 5,2$ балів H-Score. У порівнянні з застосуванням DOX окремо (експресія Вах на рівні $38,6 \pm 4,3$ балів H-Score) це більше на 27 %.

У контрольних клітинах лінії MCF-7/Dox експресія анти-апоптотичного білка Bcl2 становила $185,3 \pm 7,6$ балів H-Score. При приєднанні DOX (0,5 мкг/мл) та лазера з довжиною хвилі 660 нм експресія цього маркера знижувалась до $158,3 \pm 5,2$ балів H-Score, що на 15 % менше у порівнянні з контролем. При приєднанні червоного лазера до DOX у дозі 2,0 мкг/мл експресія досліджуваного антиапоптотичного маркера була вже на рівні $115,2 \pm 6,6$ балів H-Score, що на 38 % менше порівняно з контролем. Аналогічних результатів не вдалося досягти внаслідок застосування DOX окремо або лазера у монорежимі.

При застосуванні інфрачервоного лазерного опромінення у поєднанні з DOX також зафіксований про-апоптотичний ефект запропонованої методики у резистентній культурі клітин. У порівнянні з контролем, в групах, де було поєднано експозицію з DOX та дію лазера з довжиною хвилі 810 нм, спостерігалось суттєве підвищення експресії білків-регуляторів апоптозу p53 та Вах. При поєднанні доксорубіцину (0,5 мкг/мл) та інфрачервоного лазера

активність p53 зросла до $70,1 \pm 3,6$ балів H-Score. А при приєднанні червоного лазера до DOX у дозі 2,0 мкг/мл експресія маркера зросла до $92,3 \pm 5,0$ балів H-Score, що на 162% вище у порівнянні з групою контролю. При цьому застосування хіміопрепарату у у монорежимі призвело до меншого зниження експресії p53: $39,2 \pm 5,2$ балів H-Score після додавання 0,5 мкг/мл та $55,8 \pm 4,2$ балів H-Score після додавання 2,0 мкг/мл DOX.

Аналогічна тенденція прослідковувалася при вивченні експресії Вах. Якщо у групі контролю експресія Вах була складала $30,3 \pm 4,5$ балів H-Score, то при приєднанні впливу доксорубіцину в дозі 0,5 мкг/мл та інфрачервоного лазера рівень експресії Вах зріс до $77,2 \pm 5,2$ балів H-Score, що на 156 % більше за показник контролю, а поєднання дії лазерного опромінення з DOX у дозі 2,0 мкг/мл призвело до зростання показника експресії Вах до $130,0 \pm 5,4$ балів H-Score, що більше за контрольний показник на 333 %. Приєднання лазерного опромінення до хіміопрепарату посилило його про-апоптотичну дію, зокрема при дозуванні 2,0 мкг/мл – експресія Вах була вищою у порівнянні з застосуванням доксорубіцину окремо на 52 %.

Дослідження підтвердили, що інфрачервоне лазерне опромінення у поєднанні з DOX також впливає на рівень експресії Bcl2. Якщо у групі контролю показник експресії Bcl2 був зафіксований на рівні $185,3 \pm 7,6$ балів H-Score, то при приєднанні DOX (0,5 мкг/мл) та лазера з довжиною хвилі 810 нм експресія Bcl2 знизилась до $145,3 \pm 3,5$ балів H-Score, що менше на 22 %. А при приєднанні інфрачервоного лазера до DOX у дозі 2,0 мкг/мл експресія маркера була вже на рівні $93,7 \pm 5,2$ балів H-Score, що на 50 % менше порівняно з контролем. Слід додати, що до таких значущих змін експресії Bcl2 не призвело застосування лазера у монорежимі або доксорубіцину окремо.

Такі результати дозволили зробити висновок, що червоне (660 нм) та інфрачервоне (810 нм) лазерне випромінювання реалізує свій інгібуючий вплив на клітини ліній MCF-7 та MCF-7/Dox у поєднанні з різними дозами доксорубіцину. Це відкриває перспективи майбутніх досліджень ефектів інфрачервоного лазерного опромінення у якості фактору, що діє як ад'ювант хіміотерапії. Зростання активності про-апоптотичних регуляторів в культурах

аденокарциноми молочної залози після поєднаного впливу лазера з довжиною хвилі 810 нм і доксорубіцину в концентрації 0,5 мкг/мл – це результати, які дозволяють обґрунтовано припустити, що енергія світла створює сприятливі умови для ефективної протипухлинної дії доксорубіцину у порівняно меншій концентрації. І головне, саме лазерне опромінення, і зокрема інфрачервоного спектру з довжиною хвилі 810 нм, виступає у ролі тригерного фактору подолання резистентності до доксорубіцину у пухлинних клітинах MCF-7/Dox.

Отримані надалі дані розподілу клітин лінії MCF7 за фазами клітинного циклу свідчать про модулюючу дію як DOX самостійно, так і з приєднанням червоного та інфрачервоного лазерного опромінення. Досліди продемонстрували, що поєднання хіміотерапевтичного препарату із впливом лазерного опромінення низької енергії здатне модулювати біологічну поведінку пухлинних клітин у такий спосіб, що вони стають менш активними з точки зору готовності до поділу – про це свідчить значно менша питома вага клітин у фазах S та G2/M і значно більша у фазах G0/G1 у порівнянні з контролем. Якщо в контролі кількість клітин у фазі G0/G1 сягала 23 %, а більшість клітин перебували у S та G2/M фазах відповідно, то при застосуванні DOX кількість клітин у G0/G1 помітно збільшилась до показника 49,9 %, а питома вага тих що перебувають у фазах S та G2/M знизилася до 23,2 та 26,2 % відповідно. Слід зазначити, що застосування лазерів у монорежимах призвело до аналогічної тенденції розподілу клітин MCF7 – більша частина клітин перебувала у фазах G0/G1 та S, а менша – у фазі G2/M. Поєднана дія DOX та лазерного опромінення створила умови для максимального перерозподілу пухлинних клітин із найменшою кількістю у фазі G2/M (DOX+660 нм - $22,69 \pm 0,76$ %, DOX+810 нм - $19,22 \pm 0,77$ %) одночасно з превалюванням фази G0/G1 (DOX+660 нм - $53,66 \pm 4,22$ %, DOX+810 нм - $49,37 \pm 3,37$ %).

Зазначені зміни розподілу клітин чутливої лінії за фазами клітинного циклу асоціювалось зі зниженням експресії цикліну D1 після застосування доксорубіцину у поєднанні з лазерним опроміненням. Також, встановлено, що поєднане застосування ЛОНЕ та DOX модулює активність іншого регулятора клітинного циклу - p21. Зростання експресії p21 корелювало зі збільшенням

рівня p53, що дозволило зробити припущення, що лазерне опромінення низької енергії модулює p21 відігравати роль про-апоптотичного регулятора.

Як і у чутливій культурі MCF-7, у резистентній до DOX клітинній лінії також відбувся перерозподіл за фазами клітинного циклу у порівнянні з контрольною групою дослідження. Отримані дані продемонстрували, що застосування лазерів із довжиною хвилі 660 та 810 нм у монорежимах призвело до зниження кількості клітин у фазах S та G₂/M та зростання – у фазі G₀/G₁. Такий сценарій спостерігався також і після монотерапії доксорубіцином: якщо у контролі було 19,94±0,76% клітин у G₀/G₁ фазі, а решта – у фазах S та G₂/M, то після дії DOX у всіх трьох фазах перебувала приблизно однакова кількість клітин: 38,24±2,07% у G₀/G₁, 32,94±4,17 % у S-фазі та 31,19±0,44 % у G₂/M. Після застосування лазерів та DOX більшість клітин (DOX+660 нм - 39,82±1,08%, DOX+810нм - 43,44±1,04 %) були вже у фазі G₀/G₁, а відносно найменша їх частка у фазі G₂/M.

Отже, лазерне опромінення низької енергії створює умови для гальмування переходу клітин у фазу G₂/M і таким чином сприяє уповільненню переходу до мітозу та подальшої проліферації. Це свідчить на користь того, що ЛОНЕ здатне відігравати роль фактора, який може подолати резистентність пухлинних клітин до хіміотерапії.

Також отримані результати свідчать, що інфрачервоне лазерне опромінення у опромінення інфрачервоним лазером у поєднанні з доксорубіцином здатне модулювати експресію цикліну, який залучений у процеси регуляції клітинного циклу. Найбільш помітне зменшення експресії цикліну D1, спостерігалось після застосування доксорубіцину у поєднанні з лазерним опроміненням: до 37,2±2,12 %, що в середньому на 27,48 % менше ніж у контролі. Зменшення рівня експресії цього маркера саме у групі «810 + DOX» дозволяє обгрунтовано припустити, що ЛОНЕ інфрачервоного спектру діє з хіміотерапевтичним агентом у синергії. Примітно, що коли у досліджуваних групах клітин MCF7/Dox доксорубіцин був поєднаний із інфрачервоним лазерним опроміненням, відмічалось зростання експресії p21: до 141,2±4,14 балів H-Score. Цей результат представляється важливим, адже

показник експресії у групі «810+DOX» на 32,75 % вищий за такий у групі «DOX» та на 76,5 % вищий ніж у групі контролю.

Таким чином, лазери у поєднанні з DOX здатні впливати на біологічну поведінку пухлинних клітин, створюючи умови для перерозподілу клітин за фазами клітинного циклу і модулюючи активність цикліну D1 та p21. Отримані результати показали, що приєднання лазерного опромінення низької енергії до DOX призводять до таких біологічних наслідків, які здатні створити умови для ефективного подолання резистентності пухлинних клітин до DOX.

Цитоморфологічна оцінка мікропрепаратів клітинної лінії MCF-7 з використанням світлової мікроскопії показала, що у порівнянні з групою контролю та застосуванням доксорубіцину і лазерів окремо, приєднання до хіміотерапевтичного впливу лазерного опромінення низької енергії кардинально змінює характеристики злоякісно трансформованих клітин.

У групі контролю клітини демонстрували активний ріст, були розташовані суцільним пластом, з утворенням анастомозів, осередків структур на кшталт симпластів, то лазери у монорежимах провокували утворення ніш та появу поодиноких гігантських клітин з великими ядрами.

При поєднанні доксорубіцину та червоного лазерного випромінювання (660 нм) спостерігалася інша картина: клітини наростали у вигляді моношару, деякі клітини були позбавлені цитоплазми і складалися лише з ядер та рештків мембран, а також цитоплазма у окремих клітин була подовженою або відростчастою, ядра могли мати витягнуту або неправильну форму. А поєднання DOX з інфрачервоним лазерним випромінюванням призвело до значущих цитоморфологічних змін: у препаратах почали зустрічатися клітини дрібних розмірів, з вираженим поліморфізмом, розташуванням у невеликих скупченнях або окремо. І головне, навіть при поєднанні лазерного опромінення з довжиною хвилі 810 нм з 0,5 мкг/мл доксорубіцину у мікропрепараті фіксувалися дистрофічні зміни – превалювали пухлинні клітини полігональної та веретеноподібної форми з численним відростками, які утворювали сітчасту структуру, збільшилася кількість великих та гігантських клітин з гіперхромними ядрами, питома вага яких складала не менше 30 %.

У резистентній до DOX клітинній лінії застосування лазерів у монорежимах призвело до активного росту пухлинних клітин, утворення окремих груп клітин з нашаруваннями та анастомозами, появи окремих ділянок потоншення. Доксорубіцин без поєднання з лазерним опроміненням став причиною потоншення шару пухлинних клітин на периферії.

Внаслідок впливу інфрачервоного лазера у поєднанні з доксорубіцином на резистентну лінію MCF-7/Dox вперше у мікропрепаратах площа шару пухлинних клітин займала або 50 % або менше поля зору. На межі з великими порожнинами пухлинні клітини росли з утворенням груп та окремих нашарувань, клітини утворювали анастомози та демонстрували виражений поліморфізм: вони були різних розмірів, полігональної та веретеноподібної форми з численним відростками. Більш того, інфрачервоне лазерне опромінення навіть у поєднанні з меншою дозою хіміопрепарату (0,5 мкг/мл) також призвело до втрати зв'язків між пухлинними клітинами з утворенням великих порожнинних структур, в яких визначалися групи клітин і окремі клітини. У препаратах визначалися клітини різних розмірів з ознаками дистрофії та деструктивних змін, спостерігалася поява гігантських пухлинних клітин з великими ядрами. Більшість пухлинних клітин у мікропрепараті різко поліморфні за розмірами – від дрібних до великих, здебільше округлої, рідше неправильної форми, найчастіше містили ексцентрично розташоване одне ядро. Ядра клітин різних розмірів — великі (55-60 %), середні (25-30 %) і дрібні (10-15 %), як правило, округлої форми, з нерівним контуром.

Результати оцінки цитоморфологічних змін у мікропрепаратах підтвердили попередні висновки про те, що лазерне випромінювання створює умови для подолання резистентності пухлинних клітин до доксорубіцину. Слід зазначити, що саме вплив інфрачервоного лазера у поєднанні з DOX спричинив такі цитоморфологічні зміни, які можна оцінювати як критичні для подальшої виживаності клітин резистентної до доксорубіцину культури.

Оскільки збудження молекули DOX і активація його основного цитотоксичного метаболіту доксорубіцинолу відбувається на піку поглинання світла з довжиною хвилі 450 – 480 нм [62,92], можна зробити обґрунтоване

припущення, що чим довжина хвилі більше, тим повільніше активується DOX і тим більша та пролонгованіша його метаболізація, яка проявляє цитотоксичну дію. У якості одного з підсумків експериментальної роботи запропоновано удосконалену інтегральну схему синергічної дії інфрачервоного лазера і доксорубіцину на злоякісно трансформовану клітину (рис.4.1).

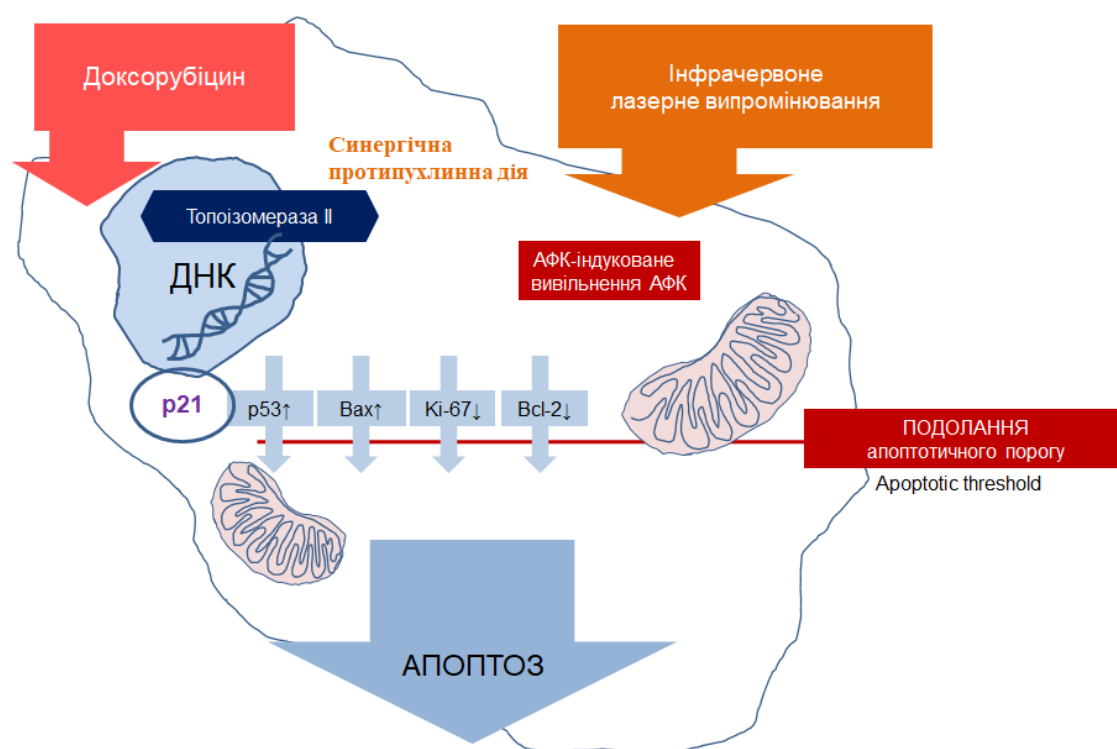


Рис.4.1. Удосконалена інтегральна схема синергічної дії інфрачервоного лазера і доксорубіцину. Повільне збудження DOX під дією інфрачервоного лазера та його пролонгована метаболізація ефективно пригнічує проліферативну активність та створює умови для виходу злоякісно трансформованої клітини в апоптоз шляхом подолання апоптотичного порогу (apoptotic threshold).

Результати представлених в даній роботі досліджень вперше окреслюють потенціал інфрачервоного лазерного випромінювання як фактора подолання резистентності клітин РМЗ людини до доксорубіцин.

Наприкінці проведеної дослідницької роботи кристалізується висновок, що інфрачервоний лазер, який діє як додатковий фактор впливу разом з

хіміопрепаратом, модулює каскади біологічних реакцій у резистентних до доксорубіцину клітинах таким чином, що вони стають більш чутливими до цитостатику. Отримані результати відкривають перспективу подолання резистентності пухлинних клітин до хіміотерапії шляхом приєднання до неї інфрачервоного лазерного випромінювання.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше закладено основу для стратегії подолання резистентності пухлинних клітин до доксорубіцину внаслідок приєднання до протипухлинної дії цитостатика червоного та інфрачервоного лазерного випромінювання. Підсумовуючи результати дисертаційної роботи, можна зробити наступні висновки:

1. Вивчено цитотоксичну активність та визначено оптимальні режими застосування червоного та інфрачервоного лазерного випромінювання на чутливі і резистентні до доксорубіцину клітинні лінії MCF-7 та MCF-7/Dox, а також вперше досліджено модифікуючий вплив лазерів на цитотоксичну активність доксорубіцину по відношенню до зазначених культур клітин РМЗ людини. Лазерне опромінення сприяє підвищенню ефективності доксорубіцину і досягненню IC30 та IC50 при дозах хіміопрепарату, які не призводили до такого ефекту без приєднання лазера.

2. Вперше доведено, що поєднане застосування лазерного випромінювання та доксорубіцину здатне викликати такі цитоморфологічні зміни пухлинних клітин, які не спостерігаються при застосуванні хіміопрепарату окремо, що свідчить про підвищення ефективності DOX внаслідок приєднання дії лазера.

3. При вивченні експресії Ki-67 вперше встановлено, що лазерне опромінення створює умови для підвищення антипроліферативної ефективності доксорубіцину як по відношенню до чутливих, так і резистентних клітин РМЗ людини.

4. Вперше показано, що за рахунок підвищення експресії маркерів p53 та Вах доксорубіцин у поєднанні з інфрачервоним лазерним випромінюванням сприяє подоланню апоптотичного порогу в культурах клітин MCF-7 та MCF-7/Dox.

5. Вперше доведено, що опромінення інфрачервоним лазером створює умови для підвищення ефективності доксорубіцину по відношенню до резистентних пухлинних клітин РМЗ людини шляхом впливу на перерозподіл за фазами клітинного циклу.

6. Вперше показано, що інфрачервоне лазерне випромінювання у поєднанні з доксорубіцином здатне сприяти зниженню експресії цикліну D1 та підвищенню експресії білка p21, що підвищує протипухлинну ефективність хіміопрепарату.

7. Результати дисертаційної роботи дозволяють розглядати приєднання інфрачервоного лазерного випромінювання до хіміотерапевтичного впливу як обґрунтовану стратегію для створення умов подолання резистентності клітин РМЗ людини до доксорубіцину і сприяння підвищенню ефективності його протипухлинної дії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Arnold M, Morgan E, Rungay H, Mafra A, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Gralow JR, Cardoso F, Siesling S, Soerjomataram I. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast*. 2022 Dec;66:15-23.
2. Chekhun VF, Andriiv AV, Lukianova NY. Significance of iodine symporter for prognosis of the disease course and efficacy of neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer of luminal and basal subtypes. *Exp Oncol*. 2017 Mar;39(1):65-68.
3. Lüftner D. New treatment options for hormone receptor positive breast cancer in 2023. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2023 Feb 1;35(1):62-66.
4. Zhang X. Molecular Classification of Breast Cancer: Relevance and Challenges. *Arch Pathol Lab Med*. 2023 Jan 1;147(1):46-51.
5. Gamalia MF. Photodynamic therapy of tumors. *Oncology. Selected lectures for students and doctors* Edited by VF Chekhun. Kyiv: Zdorovie Ukrainy. 2010: 583–96.
6. Zein R, Selting W, Hamblin MR. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. *J Biomed Opt*. 2018 Dec;23(12):1-17.
7. Camila Ramos Silva, Camila de Almeida Salvego, Maria Elisa Rostelato, Carlos Alberto Zeituni, Martha Simões Ribeiro, Photobiomodulation therapy combined with radiotherapy in the treatment of triple-negative breast cancer-bearing mice, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 220, 2021, 112215.
8. Condorelli AG, Motolese A, Borgia F, Bartolomeo LD, Bianchi L, Rossi PG, Ottone M, Guarneri F, Motolese A. Photodynamic therapy for superficial basal cell carcinomas: Clinical features of partial responses and recurrences. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022 Jan 15;37:102727.
9. Gamaleya NF, Kutsenok VV, Chekhun VF. The use of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy and diagnosis of tumors. *Oncology* 2003; 5(3): 239–43

10. Zhang Y, Li K, Han X, Chen Q, Shao L, Bai D. A photochemical-responsive nanoparticle boosts Doxorubicin uptake to suppress breast cancer cell proliferation by apoptosis. *Sci Rep.* 2022 Jun 20;12(1):10354.
11. Cacaccio JC, Durrani FA, Missert JR, Pandey RK. Photodynamic Therapy in Combination with Doxorubicin Is Superior to Monotherapy for the Treatment of Lung Cancer. *Biomedicines.* 2022;10(4):857.
12. Che Y., Zhang L., Li F., Sheng J., Xu C., Li D., Yu H., Liu W. Combination of chemotherapy and photodynamic therapy with oxygen self-supply in the form of mutual assistance for cancer therapy. *Int. J. Nanomed.* 2021;16:3779–3794.
13. Girasol CE, Braz GA, Bachmann L, Celli J, Guirro RRJ. Laser light sources for photobiomodulation: The role of power and beam characterization in treatment accuracy and reliability. *PLoS One.* 2022 Mar 30;17(3):e0266193.
14. Zhao X, Tang W, Wang H, He H. Femtosecond-laser stimulation induces senescence of tumor cells in vitro and in vivo. *Biomed Opt Express.* 2022;13(2):791-804.
15. Allison RR, Bagnato VS, Sibata CH. Future of oncologic photodynamic therapy. *Future Oncol* 2010; 6 (6): 929–40.
16. Lanzafame RJ. Photobiomodulation: an enlightened path emerges. *Photomed Laser Surg* 2013; 31 (7): 299–300.
17. Hasan T, Ortel B, Solban N, Pogue B. Photodynamic therapy of cancer. *Cancer Med* 2003; 7: 537–48.
18. Hamblin MR, Carroll JD, de Freitas LF, et al. Low-level light therapy: photobiomodulation. 2018.
19. Wilson BC, Patterson MS, Lilge L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm. *Lasers Med Sci* 1997; 12 (3): 182–99.
20. Chepurna O, Shton I, Kholin V, et al. Photodynamic therapy with laser scanning mode of tumor irradiation. B: 16th Conference on optical fibers and their applications. International society for optics and photonics; 2015: 98161F-98161F.
21. Khan I, Tang E, Arany P. Molecular pathway of near-infrared laser phototoxicity involves ATF-4 orchestrated ER stress. *Sci Rep.* 2015 Jun 1;5:10581..

22. Wu J, Chen H. [Research advances in gene-enhanced tissue engineering]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2003 Dec;20(4):733-7.
23. Scharinger V.H., Galvan O., Riechelmann H., Dudás J. Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. *Support. Care Cancer*. 2011;20:523–529.
24. Ottaviani G., Martinelli V., Rupel K., Caronni N., Naseem A., Zandonà L., Perinetti G., Gobbo M., Di Lenarda R., Bussani R., et al. Laser Therapy Inhibits Tumor Growth in Mice by Promoting Immune Surveillance and Vessel Normalization. *EBioMedicine*. 2016;11:165–172..
25. Feng C, Gong R, Zheng Q, Yan G, He M, Lei H, et al.. Synergistic anti-tumor effects of arsenic trioxide and blue LED irradiation on human osteosarcoma. *Int J Biol Sci* (2019) 15(2):386–94.
26. He M, Yan G, Wang Y, Gong R, Lei H, Yu S, et al.. Blue LED causes autophagic cell death in human osteosarcoma by increasing ROS generation and dephosphorylating EGFR. *J Cell Mol Med* (2021) 25(11):4962–73.
27. Sonokawa T, Obi N, Usuda J, Sudo Y, Hamakubo T. Development of a new minimally invasive phototherapy for lung cancer using antibody-toxin conjugate. *Thorac Cancer*. 2023 Jan 19. doi: 10.1111/1759-7714.14776.
28. Antunes HS, Herchenhorn D, Small IA, et al.. Long-term survival of a randomized phase III trial of head and neck cancer patients receiving concurrent chemoradiation therapy with or without low-level laser therapy (LLLT) to prevent oral mucositis. *Oral Oncol* 2017;71:11–15.
29. Robijns J, Nair RG, Lodewijckx J, Arany P, Barasch A, Bjordal JM, Bossi P, Chilles A, Corby PM, Epstein JB, Elad S, Fekrazad R, Fregnani ER, Genot MT, Ibarra AMC, Hamblin MR, Heiskanen V, Hu K, Klastersky J, Lalla R, Latifian S, Maiya A, Mebis J, Migliorati CA, Milstein DMJ, Murphy B, Raber-Durlacher JE, Roseboom HJ, Sonis S, Treister N, Zadik Y, Bensadoun RJ. Photobiomodulation therapy in management of cancer therapy-induced side effects: WALT position paper 2022. *Front Oncol*. 2022 Aug 30;12:927685.

30. de Faria CM, Costa CS, Bagnato VS. Photobiomodulation effects on photodynamic therapy in HNSCC cell lines. *J Photochem Photobiol B: Biol* 2021; 217: 112170.
31. Passarella S., Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2014;140:344-358.
32. Quirk BJ, Whelan HT. What Lies at the Heart of Photobiomodulation: Light, Cytochrome C Oxidase, and Nitric Oxide-Review of the Evidence [published online ahead of print, 2020 Jul 21]. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2020;38(9):527-530.
33. George S., Hamblin M.R., Abrahamse H. Effect of red light and near infrared laser on the generation of reactive oxygen species in primary dermal fibroblasts. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2018;188:60-68.
34. Alexandratou E, Yova D, Handris P, Kletsas D, Loukas S. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. *Photochem Photobiol Sci.* (2002) 1:547-52.
35. Chen ACH, Arany PR, Huang Y-Y, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, et al. Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS ONE.* (2011) 6:e22453-e.
36. Kujawa J., Pasternak K., Zavodnik I., Irzmański R., Wróbel D., Bryszewska M. The effect of near-infrared MLS laser radiation on cell membrane structure and radical generation. *Lasers Med. Sci.* 2014;29:1663-1668.
37. Migliario M., Pittarella P., Fanuli M., Rizzi M., Ren F. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med. Sci.* 2014;29:1463-1467.
38. Iuliia Golovynska, Sergii Golovynskyi, Yurii V. Stepanov, Liudmyla I. Stepanova, Junle Qu, Tymish Y. Ohulchanskyy, Red and near-infrared light evokes Ca²⁺ influx, endoplasmic reticulum release and membrane depolarization in neurons and cancer cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 214, 2021, 112088.

39. Zhang B, Pan C, Feng C, et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *ReDox Rep*. 2022;27(1):45-52.
40. Vasileiou PVS, Evangelou K, Vlasis K, et al. Mitochondrial Homeostasis and Cellular Senescence. *Cells*. 2019;8(7):686.
41. Gao M, Huang X, Wu Z, Wang L, Yuan S, Du Z, Luo S, Li R, Wang W. Synthesis of a versatile mitochondria-targeting small molecule for cancer near-infrared fluorescent imaging and radio/photodynamic/photothermal synergistic therapies. *Mater Today Bio*. 2022 Jun 7;15:100316..
42. Pan LC, Hang NL, Colley MMS, et al. Single Cell Effects of Photobiomodulation on Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species Production in Human Adipose Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 2022;11(6):972.
43. Yaqoob MD, Xu L, Li C, Leong MML, Xu DD. Targeting mitochondria for cancer photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022 Jun;38:102830.
44. Lipko NB. Photobiomodulation: Evolution and Adaptation. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*. 2022 Apr;40(4):213-233.
45. Zhang L, Du Z, He L, Liang W, Liu K, Gong S. ROS-Induced Oxidative Damage and Mitochondrial Dysfunction Mediated by Inhibition of SIRT3 in Cultured Cochlear Cells. *Neural Plast*. 2022;2022:5567174.
46. Liebert A, Capon W, Pang V, Vila D, Bicknell B, McLachlan C, Kiat H. Photophysical Mechanisms of Photobiomodulation Therapy as Precision Medicine. *Biomedicines*. 2023 Jan 17;11(2):237..
47. Wu S, Xing D, Gao X, Chen WR. High fluence low-power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species. *J Cell Physiol* 2009;218:603–611.
48. Kalyanaraman B. Teaching the basics of cancer metabolism: developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *ReDox Biol* 2017;12:833–842.
49. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997;57:1835–1840.

50. Hamblin MR, Nelson ST, Strahan JR. Photobiomodulation and Cancer: What Is the Truth? *Photomed Laser Surg.* 2018 May;36(5):241-245. ..
51. Djavid GE, Bigdeli B, Goliaei B, Nikoofar A, Hamblin MR. Photobiomodulation leads to enhanced radiosensitivity through induction of apoptosis and autophagy in human cervical cancer cells. *J Biophotonics* 2017. [Epub ahead of print]; DOI: 10.1002/jbio.201700004.
52. Wong-Riley MT, Liang HL, Eells JT, et al.. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 2005;280:4761–4771.
53. Xian D, Lai R, Song J, Xiong X, Zhong J. Emerging Perspective: Role of Increased ROS and ReDox Imbalance in Skin Carcinogenesis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:8127362.
54. Ravera S, Bertola N, Pasquale C, et al. 808-nm Photobiomodulation Affects the Viability of a Head and Neck Squamous Carcinoma Cellular Model, Acting on Energy Metabolism and Oxidative Stress Production. *Biomedicines.* 2021;9(11):1717.
55. Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial ReDox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol.* 2018;94(2):199-212.
56. Kneebone W. Immune-modulating Effects of Therapeutic Laser. *Pract Pain Manag.* 2010;10(9).
57. Rola, P. Wlodarczak, S. Lesiak, M. Doroszko, A. Wlodarczak, A. Changes in Cell Biology under the Influence of Low-Level Laser Therapy. *Photonics* 2022, 9, 502.
58. Cerdeira CD, Lima Brigagio MR, Carli ML, de Souza Ferreira C, de Oliveira Isac Moraes G, Hadad H, Costa Hanemann JA, Hamblin MR, Sperandio FF. Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. *J Biophotonics.* 2016 Dec;9(11-12):1180-1188.
59. Dube A, Bansal H, Gupta PK. Modulation of macrophage structure and function by low level He-Ne laser irradiation. *Photochem Photobiol Sci.* 2003 Aug;2(8):851-5. doi: 10.1039/b301233f. PMID: 14521221

60. de Castro MS, Miyazawa M, Nogueira ESC, Chavasco JK, Brancaglion GA, Cerdeira CD, Nogueira DA, Ionta M, Hanemann JAC, Brigaglo MRPL, Sperandio FF. Photobiomodulation enhances the Th1 immune response of human monocytes. *Lasers Med Sci.* 2022 Feb;37(1):135-148.
61. de Brito Sousa K, Rodrigues MFSD, de Souza Santos D, Mesquita-Ferrari RA, Nunes FD, de Teixeira da Silva D, Bussadori SK, Fernandes KPS. Differential expression of inflammatory and anti-inflammatory mediators by M1 and M2 macrophages after photobiomodulation with red or infrared lasers. *Lasers Med Sci.* 2020 Mar;35(2):337-343.
62. Motlagh NS, Parvin P, Ghasemi F, Atyabi F. Fluorescence properties of several chemotherapy drugs: Doxorubicin, paclitaxel and bleomycin. *Biomed Opt Express.* 2016 May 25;7(6):2400-6.
63. Guler Y, Ovey IS. LLLT enhance cyclophosphamide induced TRPM2 channel activation in human colon cancer cells. *Bratisl Lek Listy.* 2020;1(5):334-338.
64. Ito T, Tanabe K, Yamada H, Hatta H, Nishimoto S. Radiation- and photo-induced activation of 5-fluorouracil prodrugs as a strategy for the selective treatment of solid tumors. *Molecules.* 2008 Oct 1;13(10):2370-84.
65. de Brito RV, Mancini MW, Palumbo MdN, Moraes LHOd, Rodrigues GJ, Cervantes O, Sercarz JA, Paiva MB. The Rationale for "Laser-Induced Thermal Therapy (LITT) and Intratumoral Cisplatin" Approach for Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23(11):5934.
66. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014 Oct 5;740:364-78.
67. Ruan C, Liu C, Hu H, Guo XL, Jiang BP, Liang H, Shen XC. NIR-II light-modulated thermosensitive hydrogel for light-triggered cisplatin release and repeatable chemo-photothermal therapy. *Chem Sci.* 2019 Mar 27;10(17):4699-4706.
68. Fredman G, Wenande E, Hendel K, Togsverd-Bo K, Haedersdal M. Efficacy and safety of laser-assisted combination chemotherapy: A follow-up study of treatment with 5-fluorouracil and cisplatin for basal cell carcinoma. *Lasers Surg Med.* 2022 Jan;54(1):113-120..

69. Zafari J, Javani Jouni F, Jamali S, Marzoghi S, Zadehmodarres S, Razzaghi M. The effect of cisplatin-low-level laser therapy on cell viability and death of LNCaP prostate cancer cell line. *Lasers Med Sci.* 2022 Mar;37(2):1283-1288.
70. Lee GY, Myers JA, Perez SM, Singh KP, Green HN. Cisplatin combined with laser- activated nanotherapy as an adjuvant therapy for head and neck cancer. *Int J Oncol.* 2020 Nov;57(5):1169-1178.
71. Chekhun VF, Lozovska YV, Burlaka AP, Ganusevich LI, Shvets YV, Lukyanova NY, Todor IM, Tregubova NA, Naleskina LA. Remodulating effect of Doxorubicin on the state of iron-containing proteins, and reDox characteristics of tumor with allowance for its sensitivity to cytostatic agents. *Ukr Biochem J.* 2016 Jan-Feb;88(1):99-108.
72. Gobbo MG, de Mendonça Fernandes GM, Fernandes-Ferreira R, Caires LP, Caldas HC, de Campos Zuccari DAP, Bordin-Junior NA, Gonçalves Vidotti GA, Souza DRS. Evaluation of Doxorubicin in three-dimensional culture of breast cancer cells and the response in PI3K/AKT/PTEN signaling pathways: a pilot study. *Women Health.* 2022 Jul;62(6):467-475.
73. Margier M, Kuehnemann C, Hulo N, Morales J, Ashok Kumaar PV, Cros C, Cannelle H, Charmetant J, Verdin E, Canault M, Grozio A. Nicotinamide Mononucleotide Administration Prevents Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity and Loss in Physical Activity in Mice. *Cells.* 2022 Dec 27;12(1):108.
74. Song D, Shabani J, Jaiswal V, Cagliostro M, Rubinstein D, Alraies MC. Delayed Doxorubicin induced cardiomyopathy in a breast cancer patient: A case report. *Radiol Case Rep.* 2023 Jan 13;18(3):1256-1260.
75. Ping Z, Fangfang T, Yuliang Z, Xinyong C, Lang H, Fan H, Jun M, Liang S. Oxidative Stress and Pyroptosis in Doxorubicin-Induced Heart Failure and Atrial Fibrillation. *Oxid Med Cell Longev.* 2023 Jan 24;2023:4938287..
76. Sikora T, Morawska K, Lisowski W, Rytel P, Dylong A. Application of Optical Methods for Determination of Concentration of Doxorubicin in Blood and Plasma. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022 Jan 18;15(2):112.

77. Zhang T, Li N, Wang R, Sun Y, He X, Lu X, Chu L, Sun K. Enhanced therapeutic efficacy of Doxorubicin against multidrug-resistant breast cancer with reduced cardiotoxicity. *Drug Deliv.* 2023 Dec;30(1):2189118..
78. Jaiswal S, Dutta SB, Nayak D, Gupta S. Effect of Doxorubicin on the Near-Infrared Optical Properties of Indocyanine Green. *ACS Omega.* 2021 Dec 10;6(50):34842-34849..
79. Patel AG, Kaufmann SH. How does Doxorubicin work? *Elife.* 2012 Dec 18;1:e00387.
80. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Jul;21(7):440-6.
81. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, Kontek R. Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells.* 2023 Feb 19;12(4):659.
82. Sawasdee, N., Wattanapanitch, M., Thongsin, N., Phanthaphol, N., Chiawpanit, C., Thuwajit, C., Yenchitsomanus, P., Panya, A."Doxorubicin sensitizes breast cancer cells to natural killer cells in connection with increased Fas receptors". *International Journal of Molecular Medicine* 49, no. 3 (2022): 40.
83. Fleisher B, Lezeau J, Werkman C, Jacobs B, Ait-Oudhia S. In vitro to Clinical Translation of Combinatorial Effects of Doxorubicin and Abemaciclib in Rb-Positive Triple Negative Breast Cancer: A Systems-Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling Approach. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2021 Feb 18;13:87-105.
84. Tacar, O., Sriamornsak, P. and Dass, C.R. (2013), Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65: 157-170.
85. van der Zanden, S.Y., Qiao, X. and Neefjes, J. (2021), New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug Doxorubicin. *FEBS J*, 288: 6095-6111.

86. Shandilya, Manish et al. "Molecular-Level Understanding of the Anticancer Action Mechanism of Anthracyclines" In *Advances in Precision Medicine Oncology*, edited by Hilal Arnouk, Bassam Hassan. London: IntechOpen, 2020.
87. Taymaz-Nikerel, H., Karabekmez, M.E., Eraslan, S. et al. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. *Sci Rep* 8, 13672 (2018).
88. Pennisi R, Musarra-Pizzo M, Velletri T, et al. Cancer-Related Intracellular Signalling Pathways Activated by DOXorubicin/Cyclodextrin-Graphene-Based Nanomaterials. *Biomolecules*. 2022;12(1):63.
89. Quintos-Meneses H.A., Aranda-Lara L., Morales-Ávila E., Torres-García E., Camacho-López M.Á., Sánchez-Holguín M., Luna-Gutiérrez M.A., Ramírez-Durán N., Isaac-Olivé K. In Vitro Irradiation of Doxorubicin with ¹⁸F-FDG Cerenkov Radiation and Its Potential Application as a Theragnostic System. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2020;210:111961..
90. Shah S, Chandra A, Kaur A, Sabnis N, Lacko A, Gryczynski Z, Fudala R, Gryczynski I. Fluorescence properties of Doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *J Photochem Photobiol B*. 2017 May;170:65-69.
91. Greco G, Ulfo L, Turrini E, Marconi A, Costantini PE, Marforio TD, Mattioli EJ, Di Giosia M, Danielli A, Fimognari C, Calvaresi M. Light-Enhanced Cytotoxicity of Doxorubicin by Photoactivation. *Cells*. 2023 Jan 21;12(3):392.
92. Siebel, C.; Lanvers-Kaminsky, C.; Würthwein, G.; Hempel, G.; Boos, J. Bioanalysis of Doxorubicin aglycone metabolites in human plasma samples—implications for Doxorubicin drug monitoring. *Sci. Rep.* 2020, 10, 18562.
93. Li, Z.; Chen, C.; Chen, L.; Hu, D.; Yang, X.; Zhuo, W.; Chen, Y.; Yang, J.; Zhou, Y.; Mao, M.; et al. STAT5a Confers Doxorubicin Resistance to Breast Cancer by Regulating ABCB1. *Front. Oncol.* 2021, 11, 697950.
94. Mirzaei, S.; Gholami, M.H.; Hashemi, F.; Zabolian, A.; Farahani, M.V.; Hushmandi, K.; Zarrabi, A.; Goldman, A.; Ashrafizadeh, M.; Orive, G. Advances in understanding the role of P-gp in Doxorubicin resistance: Molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects. *Drug Discov. Today* 2021, 27, 436–455.

95. Clementi ME, Giardina B, Di Stasio E, Mordente A, Misiti F. Doxorubicin-derived metabolites induce release of cytochrome C and inhibition of respiration on cardiac isolated mitochondria. *Anticancer Res.* 2003;23:2445–2450.
96. Robert J. Preclinical assessment of anthracycline cardiotoxicity in laboratory animals: predictiveness and pitfalls. *Cell Biol Toxicol.* 2007;23:27-37.
97. Westaby D, Jimenez-Vacas JM, Padilha A, et al. Targeting the Intrinsic Apoptosis Pathway: A Window of Opportunity for Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;14(1):51.
98. Farzaneh Behelgardi M, Gholami Shahvir Z, Asghari SM. Apoptosis induction in human lung and colon cancer cells via impeding VEGF signaling pathways. *Mol Biol Rep.* 2022 May;49(5):3637-3647.
99. Wang Y, Lu H, Wang Z, Li Y, Chen X. TGF- β 1 Promotes Autophagy and Inhibits Apoptosis in Breast Cancer by Targeting TP63. *Front Oncol.* 2022 Apr 11;12:865067.
100. Vergaro V, Baldassarre F, De Castro F, et al. Low-Intensity Light-Responsive Anticancer Activity of Platinum(II) Complex Nanocolloids on 2D and 3D In Vitro Cancer Cell Model. *Bioinorg Chem Appl.* 2022;2022:9571217.
101. Shin, W., Han, J., Kumar, R. et al. Programmed activation of cancer cell apoptosis: A tumor-targeted phototherapeutic topoisomerase I inhibitor. *Sci Rep* 6, 29018 (2016).
102. Khorsandi, K., Kianmehr, Z., hosseinmardi, Z. et al. Anti-cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS production and induction of apoptosis and ferroptosis. *Cancer Cell Int* 20, 18 (2020).
103. Somu P., Mohanty S., Paul S. (2022) A Detailed Overview of ROS-Modulating Approaches in Cancer Treatment. In: Chakraborti S. (eds) *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Therapeutic Aspects*. Springer, Singapore.
104. Pilco-Ferreto, N., Calaf, G. M. "Influence of Doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines". *International Journal of Oncology* 49, no. 2 (2016): 753-762.

105. Yadav N, Kumar S, Marlowe T et al. Oxidative phosphorylation-dependent regulation of cancer cell apoptosis in response to anticancer agents. *Cell Death Dis.* 2015 Nov 5;6(11):e1969.
106. Karaman K, Sarica A, Tunc SK, Karaman S. Is Low-level Laser Therapy a Candidate to Be a Good Alternative in the Treatment of Mucositis in Childhood Leukemia? *J Pediatr Hematol Oncol.* 2022 Jan 1;44(1):e199-e203.
107. Heymann PG, Ziebart T et al. The enhancing effect of a laser photochemotherapy with cisplatin or zoledronic acid in primary human osteoblasts and osteosarcoma cells in vitro. *J Oral Pathol Med.* 2016 Nov;45(10):803-809.
108. Fredman G, Wenande E, Hendel K, Togsverd-Bo K, Haedersdal M. Efficacy and safety of laser-assisted combination chemotherapy: A follow-up study of treatment with 5-fluorouracil and cisplatin for basal cell carcinoma. *Lasers Surg Med.* 2022 Jan;54(1):113-120.
109. Zafari J, Javani Jouni F, Jamali S, Marzoghi S, Zadehmodarres S, Razzaghi M. The effect of cisplatin-low-level laser therapy on cell viability and death of LNCaP prostate cancer cell line. *Lasers Med Sci.* 2022 Mar;37(2):1283-1288.
110. Zafari J, Abbasinia H, Gharehyazi H, Javani Jouni F, Jamali S, Razzaghi M. Evaluation of Biological Activity of Different Wavelengths of Low-Level Laser Therapy on the Cancer Prostate Cell Line Compared With Cisplatin. *J Lasers Med Sci.* 2021 May 1;12:e17.
111. Bernerd F, Passeron T, Castiel I, Marionnet C. The Damaging Effects of Long UVA (UVA1) Rays: A Major Challenge to Preserve Skin Health and Integrity. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 26;23(15):8243.
112. Ahn WS, Bae SM, Huh SW, Lee JM, Namkoong SE, Han SJ. et al. Necrosis-like death with plasma membrane damage against cervical cancer cells by photodynamic therapy. *Int J Gynecol Cancer.* 2004;14(3):475-82..
113. Ge R, Ahn JC, Shin JI, Bahk CW, He P, Chung PS. An in vitro and in vivo study of combination therapy with Photogem®-mediated photodynamic therapy and cisplatin on mouse cancer cells (CT-26) Photomed Laser Surg. 2011;29(3):155-60.

114. Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R. Biological effects of low level laser therapy. *J Lasers Med Sci*. 2014;5(2):58-62.
115. Mohiuddin TM, Zhang C, Sheng W, Al-Rawe M, Zeppernick F, Meinhold-Heerlein I, Hussain AF. Near Infrared Photoimmunotherapy: A Review of Recent Progress and Their Target Molecules for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 31;24(3):2655.
116. Crescenzi E, Varriale L, Iovino M, Chiaviello A, Veneziani BM, Palumbo G. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(5):537-44.
117. Baxter GD, Liu L, Petrich S, Gisselman AS, Chapple C, Anders JJ. et al. Low level laser therapy (Photobiomodulation therapy) for breast cancer-related lymphedema: a systematic review. *BMC Cancer*. 2017;17(1):833.
118. Zafari J, Zadehmodarres S, Javani Jouni F, Bagheri-Hosseinabadi Z, Najjar N, Asnaashari M. Investigation into the Effect of Photodynamic Therapy and Cisplatin on the Cervical Cancer Cell Line (A2780). *J Lasers Med Sci*. 2020 Fall;11(Suppl 1):S85-S91.
119. Feller JF, Greenwood BM, Stafford RJ. Transrectal Laser Focal Therapy of Prostate Cancer. In: *Imaging and Focal Therapy of Early Prostate Cancer* [Internet]. Springer International Publishing; 2017. p. 325-43.
120. Huang Y-Y, Chen AC-H, Hamblin M. Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm. *SPIE Newsroom*. 2009;9:1-3.
121. Heymann PGB, Henkenius KSE, Ziebart T, Braun A, Hirthammer K, Halling F, Neff A, Mandic R. Modulation of Tumor Cell Metabolism by Laser Photochemotherapy with Cisplatin or Zoledronic Acid In Vitro. *Anticancer Res*. 2018 Mar;38(3):1291-1301.
122. Mansoori B, Mohammadi A, Doustvandi MA, Mohammadnejad F, Kamari F, Gjerstorff MF. et al. Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products Photodiagn. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2019;26:395-404.
123. Javani Jouni F, Abdollahi V, Zadehmodarres S, Abbasinia H, Asnaashari M, Zafari J. Combination of cisplatin treatment and photodynamic therapy attenuates

- cisplatin-induced cell toxicity in A2780 and A2780-CP cervical cancer cell lines. *Lasers Med Sci.* 2022 Mar;37(2):1175-1180.
124. Crescenzi E, Varriale L, Iovino M, Chiaviello A, Veneziani BM, Palumbo G. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(5):537-44.
 125. de Freitas LM, Soares CP, Fontana CR. Synergistic effect of photodynamic therapy and cisplatin: A novel approach for cervical cancer. *J Photochem Photobiol B.* 2014;140:365-73.
 126. Nicoletto RE, Ofner CM 3rd. Cytotoxic mechanisms of Doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2022 Mar;89(3):285-311.
 127. Suardi N, Khaniabadi PM, Taggo A, Zulbaharin SFM, Azman DKM, Gemanam SJ. Fractionated low-level laser irradiation on breast cancer (MCF 7 cells) treatment. *Lasers Med Sci.* 2022 Mar;37(2):1265-1271.
 128. Javaheri B, Esmaeeli Djavid G, Parivar K, Hekmat A. Effect of Low-Level Laser Therapy and Sinensetin (Combination therapy) on Tumor Cells (Hela) and Normal Cells (CHO). *J Lasers Med Sci.* 2021 Dec 27;12:e85.
 129. Agrawal T, Gupta GK, Rai V, Carroll JD, Hamblin MR. Pre-conditioning with low-level laser (light) therapy: light before the storm. *Dose Response.* 2014;12(4):619-49.
 130. Dompe C, Moncrieff L, Matys J, Grzech-Le?niak K, Kocherova I, Bryja A, Bruska M, Dominiak M, Mozdziak P, Skiba THI, Shibli JA, Angelova Volponi A, Kempisty B, Dyszkiewicz-Konwi?ska M. Photobiomodulation-Underlying Mechanism and Clinical Applications. *J Clin Med.* 2020 Jun 3;9(6):1724.
 131. Courtois E, Bouleftour W, Guy JB, Louati S, Bensadoun RJ, Rodriguez-Lafrasse C. Mechanisms of PhotoBioModulation (PBM) focused on oral mucositis prevention and treatment: a scoping review. *BMC Oral Health.* 2021 Apr 29;21(1):220.

132. Brandao TB, et al. Locally advanced oral squamous cell carcinoma patients treated with photobiomodulation for prevention of oral mucositis: retrospective outcomes and safety analyses. *Support Care Cancer*. 2018;26(7):2417-2423.
133. Marin-Conde F, et al. Photobiomodulation with low-level laser therapy reduces oral mucositis caused by head and neck radio-chemotherapy: prospective randomized controlled trial. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2019;48(7):917-923.
134. Silva JC, Lacava ZG, Kuckelhaus S, Silva LP, Neto LF, Sauro EE. et al. Evaluation of the use of low level laser and photosensitizer drugs in healing. *Lasers Surg Med*. 2004;34(5):451-7.
135. Wu S, Xing D, Gao X, Chen WR. High fluence low-power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species. *J Cell Physiol*. 2009;218(3):603-11.
136. Djavid GE, Goliaie B, Nikoofar A. Analysis of Radiomodulatory Effect of Low-Level Laser Irradiation by Clonogenic Survival Assay. *Photomed Laser Surg*. 2015;33(9):452-459.
137. Genot-Klastersky MT, Paesmans M, Ameye L, et al. Retrospective evaluation of the safety of low-level laser therapy/photobiomodulation in patients with head/neck cancer. *Supportive Care Cancer*. 2020;28(7):3015-3022.
138. Moshkovska T, Mayberry J. It is time to test low level laser therapy in Great Britain. *Postgrad Med J*. 2005;81(957):436-41.
139. Mansouri V, Arjmand B, Rezaei Tavirani M, Razzaghi M, Rostami-Nejad M, Hamdiah M. Evaluation of Efficacy of Low-Level Laser Therapy. *J Lasers Med Sci*. 2020;11(4):369-380.
140. Kianmehr Z, Khorsandi K, Mohammadi M, Hosseinzadeh R. Low-level laser irradiation potentiates anticancer activity of p-coumaric acid against human malignant melanoma cells. *Melanoma Res*. 2020;30(2):136-146.
141. Matsuo K, Suzuki H, Yatagai N, et al. Red LED light is influenced by IL-6 to promote the migration ability of oral squamous cell carcinoma cell line. *Kobe J Med Sci*. 2019;64(6):E210-E216.
142. Levchenko SM, Kuzmin AN, Pliss A, Ohulchanskyy TY, Prasad PN, Qu J. Cellular transformations in near-infrared light-induced apoptosis in cancer cells

- revealed by label-free CARS imaging. *J Biophotonics*. 2019;12(12):e201900179 1.
143. Takemoto MM, Garcez AS, Sperandio M. High energy density LED-based photobiomodulation inhibits squamous cell carcinoma progression in co-cultures in vitro. *J Photochem Photobiol B*. 2019;199:111592.
 144. Wu N, Tu Y, Fan G, et al. Enhanced photodynamic therapy/photothermotherapy for nasopharyngeal carcinoma via a tumour microenvironment-responsive self-oxygenated drug delivery system. *Asian J Pharm Sci*. 2022;17:253-267.
 145. Staelens M, Di Gregorio E, Kalra AP, Le HT, Hosseinkhah N, Karimpoor M, Lim L, Tuszyński JA. Near-Infrared Photobiomodulation of Living Cells, Tubulin, and Microtubules In Vitro. *Front Med Technol*. 2022 May 4;4:871196.
 146. Pan LC, Hang NL, Colley MMS, Chang J, Hsiao YC, Lu LS, Li BS, Chang CJ, Yang TS. Single Cell Effects of Photobiomodulation on Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species Production in Human Adipose Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 2022 Mar 11;11(6):972.
 147. Kato T, Furusawa A, Okada R, Inagaki F, Wakiyama H, Furumoto H, Fukushima H, Okuyama S, Choyke PL, Kobayashi H. Near-Infrared Photoimmunotherapy Targeting Podoplanin-Expressing Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Mol Cancer Ther*. 2023 Jan 3;22(1):75-88.
 148. Li Volsi A, Scialabba C, Vetri V, Cavallaro G, Licciardi M, Giammona G. Near-infrared light responsive folate targeted gold nanorods for combined photothermal-chemotherapy of osteosarcoma. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(16):14453-14469.
 149. Chen Z, Li W, Hu X, Liu M. Irradiance plays a significant role in photobiomodulation of B16F10 melanoma cells by increasing reactive oxygen species and inhibiting mitochondrial function. *Biomed Opt Express*. 2020;11(1):27-39.
 150. Diniz IMA, Souto GR, Freitas IDP, et al. Photobiomodulation enhances cisplatin cytotoxicity in a culture model with oral cell lineages. *Photochem Photobiol*. 2020;96(1):182-190.

151. Arnesano F, Losacco M, Natile G. An updated view of cisplatin transport. *Eur J Inorg Chem.* 2013;2013(15):2701-11.
152. Kim CW, Lu JN, Go S-I, Jung JH, Yi SM, Jeong J-H. et al. p53 restoration can overcome cisplatin resistance through inhibition of Akt as well as induction of Bax. *Int J Oncol Res.* 2013;43(5):1495-502.
153. Wang S, Zhou L, Tian H, Li B, Su M, Li Q, Nice EC, Huang C, Shao J, He T. Site-specific nanomodulator capable of modulation apoptosis for enhanced colorectal cancer chemo-photothermal therapy. *J Nanobiotechnology.* 2023 Jan 20;21(1):24..
154. Tang JLY, Moonshi SS, Ta HT. Nanoceria: an innovative strategy for cancer treatment. *Cell Mol Life Sci.* 2023 Jan 19;80(2):46. .
155. Sonokawa T, Obi N, Usuda J, Sudo Y, Hamakubo T. Development of a new minimally invasive phototherapy for lung cancer using antibody-toxin conjugate. *Thorac Cancer.* 2023 Jan 19.
156. Ou HC, Chu PM, Huang YT, Cheng HC, Chou WC, Yang HL, Chen HI, Tsai KL. Low-level laser prevents Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy by modulating AMPK/SIRT1/PCG-1 β -mediated mitochondrial function, apoptosis and up-regulation of pro-inflammatory responses. *Cell Biosci.* 2021 Dec 7;11(1):200.
157. Yousefi Sadeghloo A, Khorsandi K, Kianmehr Z. Synergistic effect of photodynamic treatment and Doxorubicin on triple negative breast cancer cells. *Photochem Photobiol Sci.* 2020 Nov 11;19(11):1580-1589.
158. Ren J, Hu Z, Niu G, Xia J, Wang X, Hong R, Gu J, Wang D, Ke C. Annexin A1 induces oxaliplatin resistance of gastric cancer through autophagy by targeting PI3K/AKT/mTOR. *FASEB J.* 2023 Mar;37(3):e22790.
159. Raman D, Cimpean AM, De Miglio MR. Editorial: Drug resistance in breast cancer - mechanisms and approaches to overcome chemoresistance. *Front Oncol.* 2023 Jan 4;12:1080684.
160. Tezcan O, Elshafei AS, Benderski K, Rama E, Wagner M, Moeckel D, Pola R, Pechar M, Etrych T, von Stillfried S, Kiessling F, Weiskirchen R, Meurer S,

- Lammers T. Effect of Cellular and Microenvironmental Multidrug Resistance on Tumor-Targeted Drug Delivery in Triple-Negative Breast cancer. *J Control Release*. 2023 Feb;354:784-793.
161. Guo X, Gao C, Yang DH, Li S. Exosomal circular RNAs: A chief culprit in cancer chemotherapy resistance. *Drug Resist Updat*. 2023 Mar;67:100937.
 162. Hao C, Lane J, Jiang WG. Osteopontin and Cancer: Insights into Its Role in Drug Resistance. *Biomedicines*. 2023 Jan 12;11(1):197.
 163. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull*. 2017 Sep;7(3):339-348.
 164. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci*. 2020 May 2;21(9):3233.
 165. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*. 2014 Sep 5;6(3):1769-92.
 166. Lainetti PF, Leis-Filho AF, Laufer-Amorim R, Battazza A, Fonseca-Alves CE. Mechanisms of Resistance to Chemotherapy in Breast Cancer and Possible Targets in Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2020 Dec 9;12(12):1193.
 167. Fontana F, Anselmi M, Limonta P. Molecular Mechanisms of Cancer Drug Resistance: Emerging Biomarkers and Promising Targets to Overcome Tumor Progression. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 23;14(7):1614.
 168. Bahar E, Han SY, Kim JY, Yoon H. Chemotherapy Resistance: Role of Mitochondrial and Autophagic Components. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 12;14(6):1462.
 169. Seragel-Deen F, Abdel Ghani SA, Baghdadi HM, Saafan AM. Combined Cisplatin Treatment and Photobiomodulation at High Fluence Induces Cytochrome c Release and Cytomorphologic Alterations in HEP-2 Cells. *Open Access Maced J Med Sci [Internet]*. 2020 May 15 [cited 2023 Mar. 4];8(A):366-73.

170. Obayashi, T., Funasaka, K., Ohno, E., Miyahara, R., Hirooka, Y., Hamaguchi, M. Senga, T. (2015). Treatment with near-infrared radiation promotes apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncology Letters*, 10, 1836-1840.
171. Sun J, Xing F, Braun J, Traub F, Rommens PM, Xiang Z, Ritz U. Progress of Phototherapy Applications in the Treatment of Bone Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 21;22(21):11354.
172. Su CT, Wu JH. Management of Combined Therapy (Ceritinib, A. cinnamomea, G. lucidum, and Photobiomodulation) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Case Report. *Life (Basel)*. 2022 Jun 9;12(6):862.
173. Austin E, Huang A, Wang JY, Cohen M, Heilman E, Maverakis E, Michl J, Jagdeo J. Red Light Phototherapy Using Light-Emitting Diodes Inhibits Melanoma Proliferation and Alters Tumor Microenvironments. *Front Oncol*. 2022 Jun 24;12:928484.
174. Katagiri W et al. Dual near-infrared II laser modulates the cellular reDox state of T cells and augments the efficacy of cancer immunotherapy. *FASEB J*. 2022 Oct;36(10):e22521.
175. С.В. Коноваленко, Г.В. Діденко, О.О. Круць, І.В. Прокопенко. Вивчення *in vitro* впливу лазерного опромінення у поєднанні з хіміотерапією на клітини карциноми Ерліха та макрофаги. *Онкологія*. 2022; 24(1): 20-25
176. Konovalenko S, Protsenko V, Solonitsyn Y., Osadchuk T., Konovalenko V, Omelchenko T. Effect of bioactive glass-based composite and low energy laser on bone regeneration in an experimentally induced bone defect. *Archive Euromedica*. 2022; 12(2): 75-80.
177. Konovalenko S, Lykhova O, Chepurna O, Prokopenko I, Naleskina L, Chekhun V. Study of the laser radiation effect in combination with Doxorubicin on the survival of MCF7 and MCF7/Dox culture cells. *Eureka Health Sciences*. 2022; (4): 112-121.
178. Konovalenko S, Protsenko V. Cytomorphological changes in MCF7-DOX cells and their correlation with the activity of the cycle regulator p21 after combined exposure to infrared laser and Doxorubicin. *Archive Euromedica*. 2023; 13 (1): 01-08.

179. С.В. Коноваленко, Т.В. Задворний. Поєднання лазерного опромінення і доксорубіцину як фактор індукції апоптозу пухлинних клітин. Онкологія. 2022; 26(3): 120-126.
180. Prokopenko I, Konovalenko S. Red laser photodynamic therapy of melanoma B16 in experimental model in vivo. Archive Euromedica. 2023; 13 (3): 01-07.
181. Lukyanova N.Yu., Rusetskya N.V., Tregubova N, Chekhun V. Molecular profile and cell cycle in MCF-7 cells resistant to cisplatin and Doxorubicin. Exp.oncology. 2009; 31(2): 87-91.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Konovalenko S, Protsenko V. Cytomorphological changes in MCF7-DOX cells and their correlation with the activity of the cycle regulator p21 after combined exposure to infrared laser and Doxorubicin. Archive Euromedica. 2023; 13 (1): 01-08. doi: 10.35630/2023/13/1.215 *(Особистий внесок здобувача: виконання основної експериментальної частини роботи, опис цитоморфологічних характеристик клітин за даними світлової мікроскопії, підбір та аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті)*

2. Prokopenko I, Konovalenko S. Red laser photodynamic therapy of melanoma B16 in experimental model in vivo. Archive Euromedica. 2023; 13 (3): 01-07. doi: 01-07. 10.35630/2023/13/3.304 *(Особистий внесок здобувача: аналіз отриманих результатів експериментальних досліджень, підбір та аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті).*

3. С.В. Коноваленко, Т.В. Задворний. Поєднання лазерного опромінення і доксорубіцину як фактор індукції апоптозу пухлинних клітин. Онкологія. 2022; 26(3): 120-126. doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-24-3-2022-g.10669 *(Особистий внесок здобувача: участь у виконанні імуноцитохімічного дослідження, підбір та аналіз літературних джерел, статистична обробка отриманих результатів, написання та оформлення статті).*

4. С.В. Коноваленко, Г.В. Діденко, О.О. Круць, І.В. Прокопенко. Вивчення in vitro впливу лазерного опромінення у поєднанні з хіміотерапією на клітини карциноми Ерліха та макрофаги. Онкологія. 2022; 24(1): 20-25. doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-24-1-2022-g.10352 *(Особистий внесок здобувача: підбір оптимальних режимів лазерного опромінення, отримання біологічного матеріалу для дослідження, обробка отриманих результатів, написання та оформлення статті).*

5. Konovalenko S, Protsenko V, Solonitsyn Y., Osadchuk T., Konovalenko V, Omelchenko T. Effect of bioactive glass-based composite and low energy laser on

bone regeneration in an experimentally induced bone defect. Archive Euromedica. 2022; 12(2): 75-80. doi: 75-80. 10.35630/2199-885X/2022/12/2.19 *(Особистий внесок здобувача: виконання основної експериментальної частини роботи, підбір та аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті).*

6. Konovalenko S, Lykhova O, Cherpurna O, Prokopenko I, Naleskina L, Chekhun V. Study of the laser radiation effect in combination with Doxorubicin on the survival of MCF7 and MCF7/Dox culture cells. Eureka Health Sciences. 2022; (4): 112-121.

7. О.О. Лихова, С.В. Коноваленко, О.М. Чепурна. Визначення впливу та оптимізація параметрів проведення фотобіомодуляції та фотодинамічної терапії для культур клітин раку передміхурової та молочної залози різного ступеня злоякісності. Онкологія. 2021; 23(4): 190-194.

8. О.М.Чепурна, І.В.Прокопенко, С.В.Коноваленко. Сучасні досягнення та перспективи використання низькоінтенсивного лазерного випромінювання в лікуванні онкологічних хворих. // Шляхи та перспективи розвитку експериментальної онкології в Україні (під ред. академіка НАНУ В.Ф.Чехуна) - 2021. 252 - 266.

9. Коноваленко С.В., Діденко Г.В., Круць О.О., Чепурна О.М., Прокопенко І.В. Протипухлинна ефективність поєднаного впливу доксорубіцину та лазерного опромінення. Матеріали XIV з'їзду онкологів та радіологів України, 2021: 384 - 385.

10. S. Konovalenko, L. Naleskina. Cytomorphological characteristics of MCF7-DOX breast adenocarcinoma culture cells after the influence of photobiomodulation in combination with Doxorubicin. International scientific integration '2022, Sworld-US conference proceedings: 21 - 25.

11. Konovalenko S.V., Lykhova O.O. The results of a study of the combined effects of Doxorubicin and laser irradiation on the survival of MCF7 and MCF7/Dox culture cells. Proceedings of All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell biology (Abstract book), 2022: 129.

12. Konovalenko S.V. The effect of infrared laser and low doses of Doxorubicin on the cytomorphological characteristics of MCF-7Dox tumor cells. Матеріали

шостої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології». Збірник наукових робіт. 2022: 79-81.

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. XIV з'їзд онкологів та радіологів України (30 вересня - 2 жовтня 2021 р., Київ, Україна) - усна доповідь.
2. All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology (15-17 June 2022, Kyiv, Ukraine) - усна доповідь.
3. Conference "International scientific integration '2022" (10 September, 2022, Seattle, USA) – тези.
4. VIII Міжнародний конгрес «Інноваційні технології в гінекології, мамології та естетичній медицині» (18-19 листопада 2022, Київ, Україна) - усна доповідь.
5. Шоста всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (9 – 11 листопада, Дніпро, Україна, 2022) – тези.
6. IX Міжнародний конгрес «Інноваційні технології в гінекології, мамології та естетичній медицині» (04-05 травня 2023, Київ, Україна) - усна доповідь.