ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2021. Вип. 26.

УДК 616-006.6:615.849:001.89

О. Д. Почапінський, Г. Й. Лавренчук✉, Н. П. Атаманюк, А. В. Чернишов

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Юрія Іллєнка, 53, Київ, 04050, Україна

ВІДБІР ТА АПРОБУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЕЙ НОРМАЛЬНИХ ТА ЗЛОЯКІСНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ *IN VITRO* ТА ДОСЛІДЖЕНЯ МЕЖ ЇХНЬОЇ ЧУТЛИВОСТІ ДЛЯ НЕЙТРОНОЗАХВАТНИХ, ФОТОН-ЗАХВАТНИХ АГЕНТІВ ТА ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРІВ

Мета: дослідити структурні та морфо-функціональні зміни в тест-системах злоякісних (лінія А-549) та нормальних (фібробласти 6-го пасажу) клітинах людини при інкубації з гадолінійвмісним фотон-захватним агентом «Дотавіст» та фотосенсибілізатором «Фотолон».

Методи: метод перещеплюваної культури клітин нормальних фібробластів людини та злоякісних клітин людини, цитологічні, біофізичні, статистичні.

Результати. Досліджено цитотоксичні властивості гадолінійвмісного фотон-захватного агента «Дотавіст» та фотосенсибілізатора «Фотолон» у широкому діапазоні концентрацій (5, 10, 25, 50, 100 та 200 мкл/мл) за морфо-функціональними характеристиками (кінетика росту, проліферативна та мітотична активність, наявність атипових клітин) в тест-системах *in vitro* злоякісних (клітини недрібноклітинного раку легень людини, лінія А-549) та нормальних (фібробласти 6-го пасажу) клітинах людини. Встановлено, що цитотоксичні властивості «Дотавісту» у тест-системах злоякісних та нормальних клітин проявляються за умов його застосування у високих концентраціях (100 та 200 мкл/мл). При інкубації з фотосенсибілізатором «Фотолон» цитотоксичний вплив на злоякісні клітини визначається за найменших концентрацій (5 та 10 мкл/мл); застосування фотосенсибілізатору у зростаючих концентраціях призводить до прояву генотоксичних ефектів. Цитотоксичний вплив фотосенсибілізатора на нормальні фібробласти людини виявляється в діапазоні концентрацій 5–200 мкл/мл, спостерігається помірне зменшення мітотичної активності із збільшенням концентрації. Генотоксичні властивості фотосенсибілізатора виявляються за концентрації 25 мкл/мл і вище.

Висновок. Результати дослідження ефективності впливу нейтронозахватної та фотон-захватної технологій шляхом визначення чутливості в тест-системах *in vitro* злоякісних клітин людини (клітини недрібноклітинного раку легень людини, лінія А-549) та нормальних клітин (перещеплювана культура фібробластів людини 6-го пасажу) до гадолінійвмісного фотон-захватного агенту «Дотавіст» та фотосенсибілізатора «Фотолон» у різних концентраціях складають підгрунтя доклінічного етапу оцінки ефективності препаратів, що застосовуються у бінарних технологіях.

Ключові слова: культура злоякісних клітин людини, культура фібробластів людини, нейтронозахватний агент, фотон-захватний агент, фотосенсибілізатор, проліферація, мітотичний індекс.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2021. Вип. 26. С. 260–272. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-260-272

✉ Лавренчук Галина Йосипівна, *e-mail: hl20071956@ukr.net*

O. D. Pochapinskyi, G. Yo. Lavrenchuk✉, N. P. Atamaniuk, A. V. Chernyshov

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Yuriia Illienka Str., Kyiv, 04050, Ukraine

SELECTION AND TESTING OF EXPERIMENTAL MODELS OF NORMAL AND MALIGNANT HUMAN CELLS *IN VITRO* AND EVALUATION OF THEIR SENSITIVITY RANGE TO THE NEUTRON-CAPTURE AND PHOTON-CAPTURE AGENTS AND PHOTOSENSITIZERS

Objective: to investigate the structural and morpho-functional changes in test systems of malignant (A-549 cell line) and normal (fibroblasts of the 6th passage) human cells during incubation with gadolinium-containing photon-capture agent «Dotavist» and photosensitizer «Fotolon».

Methods. The passaged (continuously interweaved) cell culture technique on normal human fibroblasts and malignant human cells; cytological, biophysical, statistical methods.

Results. The cytotoxic properties of «Dotavist» gadolinium-containing photon-capturing agent and «Photolon» photosensitizer in a wide range of concentrations (5, 10, 25, 50, 100 and 200 μl/ml) were studied by the morpho-functional characteristics (growth kinetics, proliferative and mitotic activity, presence of atypical cells) in the in vitro test systems of malignant (non-small cell lung cancer cell line A-549) and normal (6th passage fibroblasts) human cells. It was found that the cytotoxic properties of «Dotavist» in test systems of malignant and normal cells are expressed under its administration in high concentrations (100 and 200 μl/ml). During incubation with «Photolon» photosensitizer the cytotoxic effect on malignant cells was determined at the lowest concentrations (5 and 10 μl/ml). Photosensitizer administration in the increasing concentrations has lead to genotoxic effects. Cytotoxic effect of photosensitizer on the normal human fibroblasts was evident in the 5-200 μl/ml concentration range. There was a moderate decrease in mitotic activity along with increasing concentration. Genotoxic properties of photosensitizer were evident at 25 μl/ml concentration and above.

Conclusion. Study results of the effectiveness of neutron-capture and photon-capture technologies by the sensitivity assay in the in vitro test systems of human malignant cells (non-small cell lung cancer cell line A-549) and normal cells (transplantable human fibroblast culture, the 6th passage) to the gadolinium-containing photon-capture «Dotavist» agent and «Photolon» photosensitizer in different concentrations provide the basis for pre-clinical stage of evaluating the effectiveness of medications used in binary technologies.

Key words: culture of human malignant cells, culture of human fibroblasts, neutron-capture agent, photon-capture agent, photosensitizer, proliferation, mitotic index.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2021;26:260-272. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-260-272

ВСТУП

Бінарні променеві технології (БПТ) на даний час є перспективним напрямком підвищення ефективності променевої терапії, якої потребують близько 70 % онкологічних хворих [1]. Фотон-захватна терапія (ФЗТ) [2, 3] має певні переваги перед нейтронозахватною терапією (НЗТ) [4] за вартістю необхідного обладнання і проведенням процедури, однак НЗТ потенційно має більшу терапевтичну ефективність, ніж ФЗТ [5–9]. Застосування в якості зовнішнього іонізуючого випромінювання рентгенівських променів дозволяє використовувати в ФЗТ всі існуючі технічні напрацювання традиційної променевої терапії з геометричного наве-

INTRODUCTION

Binary technologies (BT) are currently a promising tool in effectiveness increase of radiation therapy, which is required in the management of about 70% of cancer patients [1]. The photon-capture therapy (FCT) [2, 3] has certain advantages over the neutron-capture therapy (NCT) [4] in terms of the costs of required equipment and procedure conduction, but NCT has the potential to provide more therapeutic effect than FCT [5–9]. The X-ray administration as a type of external ionizing radiation allows the use of all available technical developments of traditional radiation therapy in the geometric targeting

✉ Halyna Yo. Lavrenchuk, *e-mail: hl20071956@ukr.net*

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2021. Вип. 26.

дення випромінювання на мішень. Бінарні променеві технології здатні істотно знизити променеве навантаження на нормальні тканини організму порівняно з традиційною дистанційною променевою терапією. Важливим завданням променевої терапії є скорочення числа фракцій. Застосування БПТ здатне істотно знизити необхідну кількість фракцій аж до єдиної. Отримані в дослідженнях *in vitro* і *in vivo* результати показують високу терапевтичну ефективність БПТ.

Метод ФЗТ, який використовує більш доступні фотонні джерела випромінювань, може виявитись більш перспективним. Роботи зі створення технології ФЗТ інтенсифікувалися в останні роки [2]. Зацікавлення до цього виду променевої терапії обумовлено необхідністю розробки нових і ефективних методів променевої терапії з порівняно низькою вартістю опромінювальної апаратури, можливістю її масового застосування в медичних установах. Для якнайшвидшого впровадження даного методу в клінічну практику потрібно здійснити комплекс досліджень і розробок відповідно до вимог проведення доклінічних досліджень. При ФЗТ збільшення локального енерговиділення досягається присутністю препаратів з важкими елементами: ^{53}I, ^{64}Gd, ^{78}Pt, ^{79}Au, ^{157}Gd та ін. Ураження клітин пухлини формується за рахунок вторинного випромінювання, що виникає внаслідок взаємодії фотонів з атомами важких елементів. Розрахунки величини відносного збільшення енерговиділення показують помітний ефект збільшення поглинутої дози в залежності від внутрішньотканинного спектру фотонів. Результати застосування технології ФЗТ для лікування перещеплюваних пухлин у мишей показують можливість ефективного пригнічення росту пухлини. Термін «фотон-захватна терапія» запропонований авторами патенту з огляду на його аналоги з процесами, що перебігають при НЗТ. За кордоном технологія має наступні назви: Photon Activation Therapy (PAT) (США) або Photon Activation Therapy with Platinum (PATPlat) (Франція); Contrast-Enhanced Radiation Therapy (CERT) (Франція, Великобританія, Німеччина, США, Мексика, Австралія); Gold Nanoparticles Radiation Therapy (GNRT) (Великобританія, Німеччина, США, Австралія тощо). Кожна з назв відображає нюанси застосування, пов'язані з використанням того чи іншого препарату, що містить елемент з великим атомним числом Z. Виділення енергії обумовлено електронами фотопоглинання і супутнього Оже-каскаду на атомах елементів з великим Z, що входять до складу відомих препаратів, що містять: йод-53: Йодопомідол, Йод-дезоксиуридин;

of radiation. BT of radiotherapy are capable to significantly reduce the radiation burden on the normal body tissues compared to traditional external-beam radiotherapy. Reducing the number of fractions is an important task in radiation therapy. BP of radiotherapy application can significantly reduce the required number of fractions down to a single one. Results obtained in the *in vitro* and *in vivo* studies show the high therapeutic efficacy of BP of radiotherapy.

FCT where the more obtainable photon radiation sources are used may be more promising. Efforts on the development of FCT technologies were intensified in recent years [2]. Interest in this type of radiation therapy is due to the need to develop new and effective methods of radiation therapy with a relatively low cost of irradiation equipment and possible widespread use in healthcare institutions. To implement as soon as possible this method in clinical practice it is necessary to carry out a set of research and development work in accordance with the requirements of pre-clinical studies. Increase in local energy release under the FCT is reached due to the presence of medication agents containing heavy elements i.e. ^{53}I, ^{64}Gd, ^{78}Pt, ^{79}Au, ^{157}Gd, etc. Tumor cell damage occurs here due to the secondary radiation, which appears due to interaction of photons with atoms of heavy elements. Calculations of the relative increase in energy release show a noticeable effect of increasing the absorbed radiation dose depending on the intratissue photon spectrum. Results of FCT technology in the treatment of grafted tumors in mice show possible effective inhibition of tumor growth. The «photon-capture therapy» term was proposed by the authors of the patent in a view of its analogues with the processes occurring in NCT. The technology has the following names abroad: Photon Activation Therapy (PAT) (USA) or Photon Activation Therapy with Platinum (PATPlat) (France); Contrast-Enhanced Radiation Therapy (CERT) (France, UK, Germany, USA, Mexico, Australia); Gold Nanoparticles Radiation Therapy (GNRT) (UK, Germany, USA, Australia, etc.). Each name reflects the nuances of technology application related to the use of one or another medication agent containing an element with high atomic number Z. Energy release here is due to the electron photoabsorption and accompanying Auger cascade in the atoms of elements with a large Z, which are a part of the known drugs containing iodine-53 – Iodopomidol, Iodine-

гадоліній (^{64}Gd): Магневіст, Пріновіст, Ультравіст, Діпентаст та ін .; платину (^{78}Pt): Цисплатин, карбоплатин та ін., а також перспективних препаратів, що містять наночастинки золота (^{79}Au). Як очікується, при досягненні оптимального співвідношення концентрацій препарату, що містить зазначені елементи, в пухлині та в нормальній тканині і при опроміненні фотонами оптимального спектру можливо створити в опроміненій мішені дозу, згубну для пухлини і в той же час толерантну для нормальних тканин. До переваг ФЗТ, у порівнянні з традиційними методами променевої терапії, відноситься те, що підведення необхідної терапевтичної дози до біологічної мішені (пухлини) здійснюється створенням певної концентрації препарату, а не націлюванням і фокусуванням пучка випромінювань.

Метод фотодинамічної терапії (ФДТ), який поєднує можливості сучасної фармакології та досягнення квантової електроніки, успішно впроваджується у провідних онкологічних клініках світу і є дієвою альтернативою існуючим в практиці лікування онкологічних хворих [10–13]. Він високоефективний, повністю безболісний під час і після процедури, не вимагає обмежень життєдіяльності (під час лікування всього лише не рекомендується відвідувати солярій і інтенсивно засмагати), безпечний. Впровадження цього методу в медичну практику важко переоцінити, деякі фахівці вважають, що воно може бути порівнянне за значимістю з впровадженням антибіотиків [5].

Дослідження біологічних ефектів фотосенсибілізаторів за умов комбінованого впливу світлового та іонізуючого випромінювання (поєднання ФДТ і НЗТ, ФДТ і ФЗТ) з використанням культури клітин має провідне значення для розкриття механізмів їх поєднаної дії [12, 14]. Незважаючи на широкий спектр та інтенсивність досліджень з бінарних впливів на пухлини, повідомлення у світовій літературі про дослідження поєднаного (комбінованого) застосування цих методів, або створення устаткування для таких досліджень, на сьогодні дуже обмежені.

Потенціал БПТ може бути повністю розкритий лише при розробці спеціальних препаратів, які відповідають вимогам. У складі таких препаратів, що накопичуються переважно у клітинах пухлини, присутні хімічні елементи, які поглинають зовнішнє іонізуюче випромінювання значно ефективніше, ніж хімічні елементи, присутні в біологічних тканинах. В результаті вибіркової взаємодії випромінювання з такими препаратами, що знаходяться в пухлині, відбувається збільшення поглинутої дози від кількох відсотків до п’яти разів.

deoxyuridine, gadolinium (^{64}Gd) – Magnevist, Prinovist, Ultravist, Dipentast, etc., platinum (^{78}Pt) – Cisplatin, Carboplatin, etc., as well as promising drugs containing gold (^{79}Au) nanoparticles. As expected, when the optimal ratio of concentrations of medication agent containing these elements in the tumor and in normal tissue is reached and when irradiated with photons of the optimal spectrum it is possible to create a dose harmful to the tumor and tolerant to normal tissues in the irradiated target. Providing a required therapeutic dose to the biological target (tumor) through creating a certain concentration of the medication agent, rather than targeting and focusing the radiation beam, is the FCT advantage compared to the traditional methods of radiation therapy.

The photodynamic therapy (PDT) method combining the capabilities of modern pharmacology and achievements of quantum electronics has been successfully implemented in the leading cancer clinics around the world being an effective alternative to the existing tools in treatment of cancer patients [10–13]. It is highly effective, completely painless during and after the procedure, requires no restrictions in lifestyle (during treatment it is only not recommended to visit a solarium and take sunbathe intensely), and safe. Introduction of this method in healthcare practice can be hardly overestimated, with some experts believe that it can be compared with introduction of antibiotics in its importance [5].

Study of biological effects of photosensitizers under the combined effects of light and ionizing radiation (combination of PDT and NCT, PDT and FCT) using a cell culture is of paramount importance for revealing the mechanisms of their combined effect [12, 14]. Despite wide range and intensity of research on binary effects on tumors, the reports in the world literature on studies of a combined use of these methods or equipment manufacturing for such studies are currently very limited.

The potential of BT of radiotherapy can be fully unlocked only through the development of especial medication agents that meet the specific requirements. Such drugs accumulated mainly in tumor cells contain chemical elements that absorb external ionizing radiation much more efficiently than chemical elements present in biological tissues. As a result of selective interaction of radiation with such drugs in the tumor the absorbed dose is increased from several percent to five times.

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2021. Вип. 26.

МЕТА

Дослідити структурні та морфофункціональні зміни в тест-системах злоякісних (лінія А-549) та нормальних (фібробласти 6-го пасажу) клітинах людини при інкубації з гадолінійвмісним фотон-захватним агентом «Дотавіст» та фотосенсибілізатором «Фотолон».

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження виконані на перещеплюваній моношаровій культурі клітин недрібноклітинного раку легені людини лінії А-549, що походять з карциноми легень людини епітеліоподібної морфології, та проліферуючих фібробластах людини, наданих Банком клітинних культур ІЕПОР НАН України. Клітини культивували в повному поживному середовищі Advanced DMEM F/12 (GIBCO), що містило 2 % ембріональної сироватки теляти (GIBCO), Pen Strep Glutamin (GIBCO), згідно зі стандартними методами роботи з клітинними штамами [15]. Клітини вирощували при постійній температурі 37°С та 5 % CO_2 на покривних скельцях розмірами (16 х 8) мм, які знаходилися на дні скляних пляшечок, до конфлуентного стану моношару (1–5 діб). Для вивчення кінетики росту культури клітин інкубували впродовж 5 діб, кожні 24 год готували морфологічні препарати за загальноприйнятою методикою (по 3 препарати на точку). У якості тест-системи нормальних клітин була обрана перещеплювана культура фібробластів людини 6-го пасажу. Клітини вирощували при постійній температурі 37°С та 5 % CO_2 на покривних скельцях розмірами (16 х 8) мм, які знаходилися на дні скляних пляшечок, до конфлуентного стану моношару (1–5 діб). Для вивчення кінетики росту культури клітин інкубували впродовж 5 діб, кожні 24 год готували морфологічні препарати за загальноприйнятою методикою. «Фотолон» та «Дотавіст» до клітин додавали через 24 год після посадки в концентраціях 5, 10, 25, 50, 75, 100 та 200 мкл/мл і культивували впродовж 5 діб.

Морфофункціональні характеристики культури клітин оцінювали у різні терміни культивування клітин за показниками життєздатності: проліферативна і мітотична активність та кількість атипових клітин. Проліферативну активність клітин оцінювали за кінетикою росту. Упродовж п'яти діб, щоденно, готували препарати: фіксували 96° етанолом та фарбували гематоксилін-еозином. На предметне скло препарати з пофарбованими клітинами наклеювали канадським бальзамом. Під оптичним мікроскопом «Axioscop» (West Germany) при збільшенні х 1000 у межах сітки

OBJECTIVE

The study objective was to investigate the structural and morpho-functional changes in test systems of malignant (A-549 cell line) and normal (fibroblasts of the 6th passage) human cells during incubation with gadolinium-containing photon-capture agent «Dotavist» and photosensitizer «Fotolon».

MATERIALS AND METHODS

Study was conducted on the passaged monolayer culture of non-small cells lung cancer cell line A-549 originated from human lung carcinoma of epithelioid morphology and proliferating human fibroblasts provided by the Cell Culture Bank, R.E. Kavetsky IEPOR NAS of Ukraine. Cells were cultured in the complete nutrient medium Advanced DMEM F/12 (GIBCO), containing 2% fetal calf serum (GIBCO) and Pen Strep Glutamin (GIBCO) according to the standard methods of working with cell strains [15]. Cells were cultured at a constant temperature of 37°C and 5% CO_2 on the cover slides (16 х 8) mm placed at the bottom of glass bottles, until the confluent state of the monolayer achieved (1–5 days). To study the kinetics of cell culture growth they were incubated for 5 days. Morphological preparations were prepared every 24 hours according to the generally accepted method (3 preparations per point). The passaged culture of human fibroblasts (the 6th passage) was selected as a test system of normal cells. Cells were cultured at a constant temperature of 37°C and 5% CO_2 on the cover slides (16 х 8) mm placed at the bottom of glass bottles, until the confluent state of the monolayer achieved (1–5 days). To study the kinetics of cell culture growth they were incubated for 5 days. Morphological preparations were prepared every 24 hours according to the generally accepted method. «Photolon» and «Dotavist» agents were added to the cells 24 h after planting at concentrations of 5, 10, 25, 50, 75, 100 and 200 μl/ml and cultured for 5 days.

Morphofunctional characteristics of cell culture were evaluated at different times of culturing by viability parameters, namely the proliferative and mitotic activity and number of atypical cells. Cell proliferative activity was assessed by the growth kinetics. Preparations were prepared daily for five days making fixation with 96° ethanol and staining with hematoxylin and eosin. Preparations with stained cells were fixed to the glass slides with Canadian balm. Total number of cells, number of mitoses and number of atypical cells were counted using the optical

методом випадкових полів за С. Б. Стефановим підраховували загальну кількість клітин, кількість мітозів і кількість атипових клітин. Мітотичний індекс та індекс атипових клітин розраховувався на 1000 клітин (‰).

Статистичний аналіз вірогідності отриманих даних проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента, використовуючи комп'ютерні програми Microsoft Excel та Biostat з попередньою перевіркою гіпотези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова–Смірнова [16]. При виконанні експериментальних досліджень було проаналізовано 1942 препарати культур клітин.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У якості моделі пухлинного росту нами було обрано перещеплювану моношарову культуру клітин недрібноклітинного раку легені людини лінії А-549, що походять з карциноми легень людини, епітеліоподібної морфології. Вивчення кінетики росту клітин А-549 впродовж 5 діб показало, що вона має лаг-фазу – 1–2 доби, впродовж якої клітини прикріплюються до субстрату, розпластаються і запускають процес поділу, проте у цей період мітотичний індекс ще низький. Далі слідує фаза логарифмічнго росту: 2–5 діб, впродовж яких відбувається інтенсивне збільшення кількості клітин за рахунок підвищення інтенсивності мітотичної активності клітин у культурі. У цих умовах істотно зростає щільність клітинної популяції – кофлуент культури становить 80 % (рис.1).

На 5–6-ту добу мітотичний індекс та щільність клітинної популяції зменшується. У культурі інтактних клітин надзвичайно мало атипових (багатоядерних, з мікроядрами, апоптотичних) клітин.

Аналогічний розвиток проліферативної активності спостерігали і для перещеплюваних нормальних фібробластів людини 6-го пасажу.

microscope «Axioscop» (West Germany) at x1000 magnification within the grid by the method of random fields by S.B. Stefanov. Mitotic index and atypical cell index were calculated per 1000 cells (‰).

Statistical analysis of the significance of obtained data was performed with Student's *t*-test using the computer software Microsoft Excel and Biostat with preliminary testing of the hypothesis of a normal law for distribution of random variables by the Kolmogorov-Smirnov test [16]. During experimental studies the 1942 cell culture preparations were analyzed.

RESULTS AND DISCUSSION

As a model of tumor growth a passaged monolayer culture of the non-small cell lung cancer cell line A-549 was chosen derived from human lung carcinoma featuring the epitheloid cell morphology. Assay of growth kinetics of the A-549 cells for 5 days showed a lag phase for 1–2 days during which the cells attach to substrate, spread and start the process of division, however during this period the mitotic index is still low. This was followed by a phase of logarithmic growth for 2–5 days with intensive increase in the number of cells due to amplified intensity of mitotic activity of cells in the culture. Under these conditions the density of cell population increased significantly, as the culture confluent was 80% (Fig. 1).

On the 5^{th}–6^{th} day the mitotic index and cell population density had decreased. There were extremely few atypical (multinucleated, micronucleus, apoptotic) cells in the intact cell culture.

Similar development of proliferative activity was observed in the passaged normal human fibroblasts (6^{th} passage).

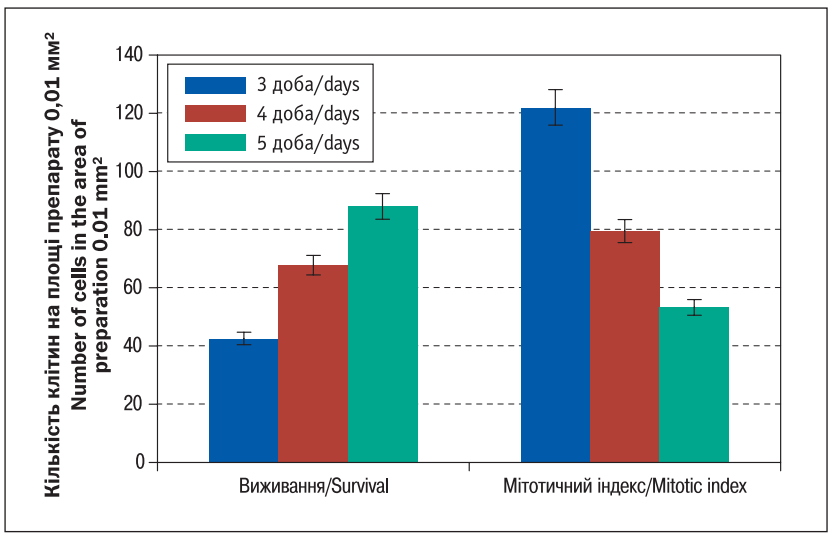

Рисунок 1. Кінетика росту клітин лінії А-549 в контролі

Figure 1. Kinetics of A-549 cell growth in control

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2021. Вип. 26.

Цінність таких моделей клітинного росту в тому, що вони при перещепленні незмінно дають однакову кінетику росту, а це важливо для повторюваності результатів за різних умов.

Вибір «Дотавіст» в якості фотонзахватного агента зумовлений наявністю гадолінію у складі цього препарату, що важливо для фотон-захватної терапії. «Дотавіст» – це гадотерова кислота, що має парамагнітні властивості, які посилюють контрастування при магнітно-резонансній томографії (МРТ). Контрастне підсилення при МРТ головного та спинного мозку застосовується для виявлення пухлин мозку, хребта, оточуючих тканин, пролапсів міжхребцевих дисків, інфекційних захворювань, всього тіла, включаючи візуалізацію патології нирок, серця, матки, яєчників, органів грудної і черевної порожнини, кістково-суглобової патології. Гадотерова кислота не має специфічної фармакодинамічної активності та є біологічно високоінертною. Використовується виключно з діагностичною метою, якщо застосування МРТ без контрастного підсилення неможливе.

Додавання «Дотавіст» в ростове середовище до культури клітин А-549 через 24 год після посадки у різних концентраціях виявило, що за концентрації 5, 10, 25 мкл/мл кінетика росту клітин не змінюється, щільність клітинної популяції та мітотична активність не відрізняється від контролю (рис. 2).

Водночас у структурі популяції з'являються атипові клітини – двоядерні, клітини з мікроядрами та з ознаками апоптозу. Їх кількість підвищується при збільшенні концентрації препарату до 50 та 100 мкл/мл. За концентрації 200 мкл/мл спостерігали інгібування проліферативної та мітотичної активності злоякісних

The value of such cell growth models is that they invariably give the same growth kinetics when passaged, and this is important for repeatability of results under different conditions.

The choice of «Dotavist» as a photon-capture agent was due to the presence of gadolinium in it, which is important for the photon capture therapy. «Dotavist» is a gadoteric acid featuring paramagnetic properties enhancing the contrast effect in magnetic resonance imaging (MRI). Contrast enhancement in MRI of the brain and spinal cord is used to detect the brain, spinal and surrounding tissue tumors, prolapse of intervertebral discs, infectious diseases, both with the whole body imaging, including kidney, heart, uterus, ovaries, thoracic and abdominal organs, bones and joints. Gadoteric acid has no specific pharmacodynamic activity and is biologically highly inert. It is used exclusively for diagnostic purpose if the MRI without contrast enhancement is not possible.

Addition of «Dotavist» to the growth medium of A-549 cell culture 24 h after planting at various concentrations resulted in neither change of cell growth kinetics nor difference in cell population density or mitotic activity from control at 5, 10, and 25 μl/ml drug concentration (Fig. 2).

Concurrently the atypical cells i.e. dinuclear, with micronuclei and with signs of apoptosis appeared in the structure of population. Their number increased with increasing the drug concentration up to 50 and 100 μl/ml. At 200 μl/ml concentration the inhibition of proliferative and

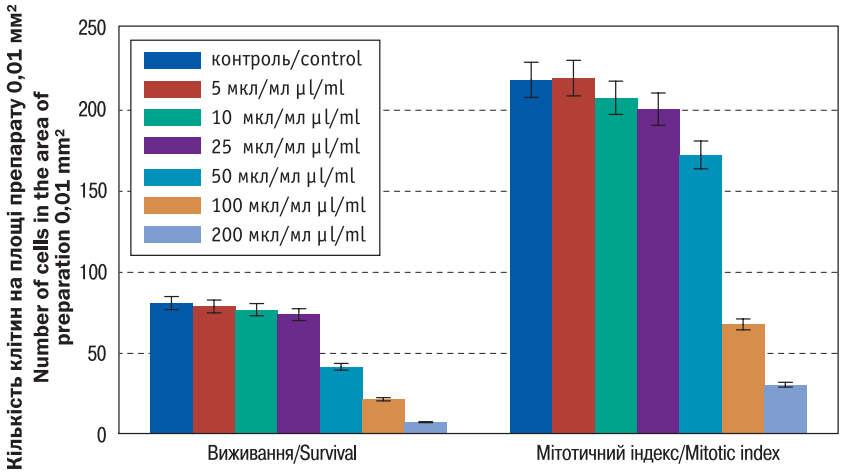

Рисунок 2. Залежність морфофункціональних характеристик клітин лінії А-549 при інкубації з препаратом «Дотавіст» у різних концентраціях на 5-ту добу культивування

Figure 2. Dependence of morphofunctional characteristics of A-549 line cells during incubation with «Dotavist» drug in various concentrations on the 5th day of cultivation

клітин людини – лінії А-549. За цих умов змінюється форма клітин, зменшується кількість цитоплазми, зміщується ядро в клітинах, відмічено багато атипових клітин. Щільність клітинної популяції складає 10 %. Відмічено деструкцію моношару клітин.

Отже, досліджуваний гадолінійвмісний препарат «Дотавіст» володіє за високої концентрації 100 - 200 мкл/мл істотним цитотоксичним впливом на злоякісні клітини людини лінії А-549. Для подальшого вивчення клітинних реакцій при використанні «Дотавіст» у фотон-захватній терапії застосовували наступні концентрації препарата: 10 та 25 мкл/мл.

При ФТЗ клітин пухлини дуже важливо зберегти баланс між опроміненням максимального об'єму тканини пухлини та якнайменшої частини нормальних клітин, які у подальшому заповнять місце пухлини. Визначення цитотоксичного впливу препарату «Дотавіст» на нормальні фібробласти людини показало, що зменшення на 50 % щільності клітинної популяції фібробластів спостерігали за концентрації 50 мкл/мл і вище, мітотичний індекс статистично достовірно зменшувався за цих же концентрацій (рис. 3).

Слід зазначити, що за концентрацій гадолінійвмісного препарату 100 і 200 мкл/мл у культурі клітин виявляється значна кількість атипових клітин, а саме: клітин зі зміненою формою і кількістю ядер, з мікроядрами, з ознаками апоптозу, тобто генетично нестабільних клітин. Це опосередковано вказує на вплив препарату «Дотавіст» на поділ та геном нормальних фібробластів.

Отже, згідно з результатами експериментального дослідження цитотоксичності препарату «Дотавіст»

mitotic activity of human malignant cells (line A-549) was observed. Under these conditions the cell shape changed with cytoplasm amount decrease and nucleus displacement. A lot of atypical cells were observed. Density of the cell population was 10%. Destruction of cellular monolayer was noted.

Therefore, the studied gadolinium-containing drug «Dotavist» at a high concentration of 100-200 μl/ml makes a significant cytotoxic effect on human malignant cells of the line A-549. Such concentrations of the drug as 10 and 25 μl/ml were used further to study the cellular reactions when using «Dotavist» in the photon-capture therapy.

In PCT of tumor cells it is critical to maintain a balance between the irradiation on maximum tumor tissue volume and smallest portion of normal cells that will fill the tumor site. Assay of cytotoxic effect of «Dotavist» on the normal human fibroblasts showed a 50% decrease in the cell population density at concentrations of 50 μl/ml and above. Mitotic index was significantly reduced at the same concentrations (Fig. 3).

It should be noted that a significant number of atypical cells, namely cells with abnormal shape and changed number of nuclei, with micronuclei, with signs of apoptosis, i.e. the genetically unstable cells were found in the cell culture at 100 and 200 μl/ml concentrations of gadolinium-containing drug. This indirectly indicates the effect of «Dotavist» on division and genome of normal fibroblasts.

Therefore, according to the results of experimental study of «Dotavist» drug cytotoxicity its

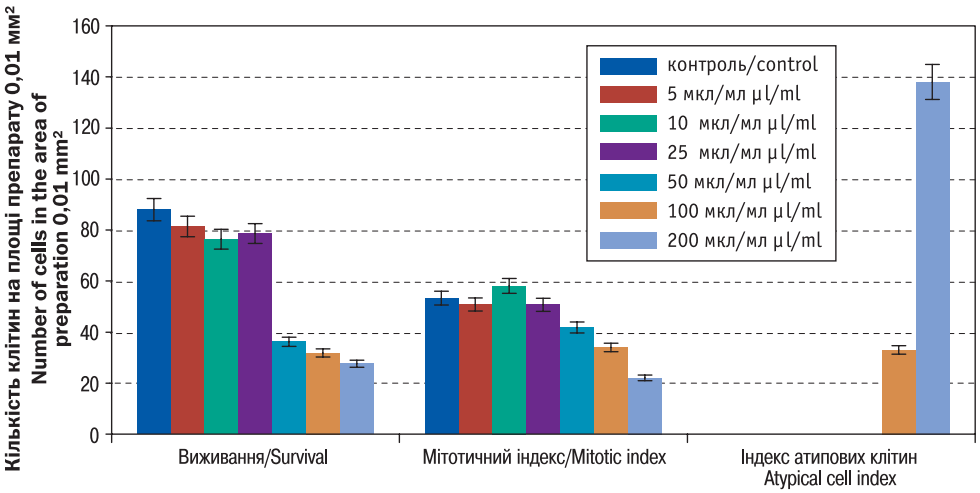

Рисунок 3. Залежність морфофункціональних характеристик нормальних фібробластів людини 6-го пасажу при інкубації з препаратом «Дотавіст» у різних концентраціях

Figure 3. Dependence of morphofunctional characteristics of normal human fibroblasts (6th passage) during incubation with «Dotavist» drug at various concentrations

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2021. Вип. 26.

для вивчення фотон-захватного впливу на нормальні фібробласти людини слід використовувати концентрації препарату 10 і 25 мкл/мл у ростовому середовищі.

Метод фотодинамічної терапії (ФДТ) є одним із ефективних малоінвазивних сучасних методів лікування диспластичних змін і злоякісних новоутворень, особливо на ранніх стадіях розвитку. Для успішного виконання ФДТ необхідні певні умови, а саме: оптимальна концентрація фотосенсибілізатора, опромінення світлом оптичного діапазону певної довжини хвилі, що відповідає максимуму поглинання фотосенсибілізатора і достатньою щільністю потужності випромінювання, яке поглинається пухлиною. Активна речовина фотосенсибілізатора «Фотолон» – хлорин Е6 – вибірково накопичується у патологічній тканині (доброякісні та злоякісні новоутворення різного ґенезу і локалізації) і при локальному впливу світла з довжиною хвиль 660–670 нм (червоне світло) забезпечує фотосенсибілізуючий ефект, який призводить до пошкодження пухлинної тканини. «Фотолон» також є високоінформативним діагностичним засобом при спектрофлуоресцентному дослідженні.

За результатами експериментального дослідження було встановлено, що при додаванні до культури злоякісних клітин людини А-549 фотосенсибілізатора «Фотолон» зміна структури моношару спостерігалась уже за концентрації 5 та 10 мкг/мл, а саме: щільність клітинної популяції була значно меншою, ніж в інтактних культурах; зменшувалась мітотична активність і зростала кількість атипових клітин - двоядерних і клітин з мікроядрами, а також апоптотичних клітин на різних стадіях (рис. 4).

concentrations of 10 and 25 µl/ml in growth medium should be used to evaluate the photon-capture effect on the normal human fibroblasts.

The photodynamic therapy (PDT) method is one of the effective and minimally invasive modern tool in the treatment of dysplastic lesions and malignant neoplasms, especially in the early stages of development. Successful performance of PDT requires certain conditions, namely the optimal photosensitizer concentration, light irradiation in the optical range of a certain wavelength corresponding the maximum absorption by photosensitizer and sufficient power density of radiation absorbed by the tumor. Chlorine E6 as an active substance of the «Photolon» photosensitizer is selectively accumulated in abnormal tissue (benign and malignant tumors of different genesis and localization) and under local exposure to the light with a wavelength of 660–670 nm (red light) provides a photosensitizing effect, which leads to the tumor tissue damage. «Fotolon» is also a highly informative diagnostic tool in spectrofluorescent studies.

According to the results of experimental study it was found that when adding the «Photolon» photosensitizer to the culture of human malignant cells line A-549 a change in monolayer structure was observed at concentrations of 5 and 10 µg/ml. Namely the cell population density was much lower than in intact cultures, mitotic activity was decreased and the number of atypical cells i.e. dinuclear and micronucleus ones, as well as apoptotic cells at different stages was increased (Fig. 4).

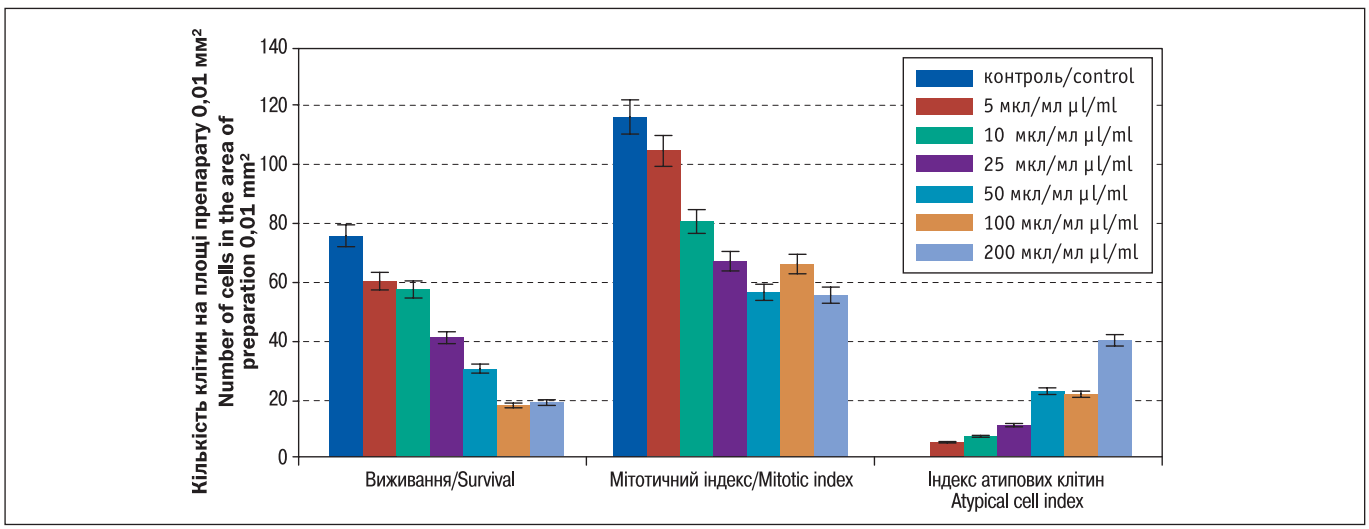

Рисунок 4. Залежність морфофункціональних характеристик клітин лінії А-549 при інкубації з фотосенсибілізатором «Фотолон» у різних концентраціях на 5-ту добу культивування

Figure 4. Dependence of morphofunctional characteristics of A-549 line cells during incubation with «Photolon» photosensitizer at various concentrations on the 5th day of cultivation

Це може свідчити про генотоксичну дію фотосенсибілізатора на злоякісні клітини. Морфологічні зміни клітин проявлялись у вигляді вакуолізованої цитоплазми, ацентрично розміщеними ядрами. Форма клітин, зазвичай епітеліоподібна, трансформувалась у полігональну з багатьма псевдоподіями та виростами.

Таким чином, фотосенсибілізатор «Фотолон», починаючи з найменших концентрацій (5 та 10 мкл/мл), чинить цитотоксичний вплив на культуру злоякісних клітин людини А-549. При підвищенні концентрації фотосенсибілізатора зменшується щільність клітинної популяції, мітотична активність клітин та зростає кількість атипових клітин: двоядерних, клітин з мікроядрами та з ознаками апоптозу. Збільшення концентрації фотосенсибілізатора до 100 та 200 мкл/мл призвело до деструктивних змін клітинного моношару: зменшення розмірів клітин, втрати цитоплазми, зменшення кількості мітозів, збільшення аномальних клітин (двоядерних та клітин з мікроядрами). Одночасно виявляли збільшення кількості клітин з різноманітними ядерними протрузіями – ядерними аномаліями, такими як каріорексис, хвостаті ядра, ядра атипової форми, гантелеподібні ядра тощо.

Експериментальне дослідження цитотоксичного впливу фотосенсибілізатора «Фотолон» на кінетику росту, проліферативну та мітотичну активність нормальних фібробластів людини дозволило виявити особливості морфофункціональних змін залежно від концентрації фотосенсибілізатора (рис. 5).

В діапазоні концентрацій 5–200 мкл/мл не спостерігали статистично значущих відмінностей щіль-

This may indicate a genotoxic effect of photosensitizer on malignant cells. Cellular morphological changes were evident through the vacuolated cytoplasm and eccentrically displaced nuclei. Cellular shape, usually elliptical, had transformed into polygonal ones with many pseudopodia and outgrowths.

Thus, the «Photolon» photosensitizer has a cytotoxic effect starting from the lowest concentrations (5 and 10 μl/ml) on the culture of human malignant cells line A-549. As the concentration of photosensitizer increases the cell population density and mitotic activity decreases along with elevation of number of the atypical cells (binuclear, with micronuclei and with signs of apoptosis). Increasing the concentration of photosensitizer up to 100 and 200 μl/ml had led to destructive changes in cell monolayer featuring the decreased cell size, cytoplasmic loss, reduced mitosis number, and increased abnormal cells (dinuclear and micronuclear ones). At the same time, there was found an increase in the number of cells with various nuclear protrusions i.e. nuclear anomalies, such as karyorrhexis, caudate nuclei, atypical nuclei, dumbbell-shaped nuclei, etc.

Experimental study of cytotoxic effect of «Fotolon» photosensitizer on growth kinetics, proliferative and mitotic activity of the normal human fibroblasts showed the features of morphofunctional changes depending on photosensitizer concentration (Fig. 5).

No statistically significant differences in the cell population density were observed in 5–200 μl/ml

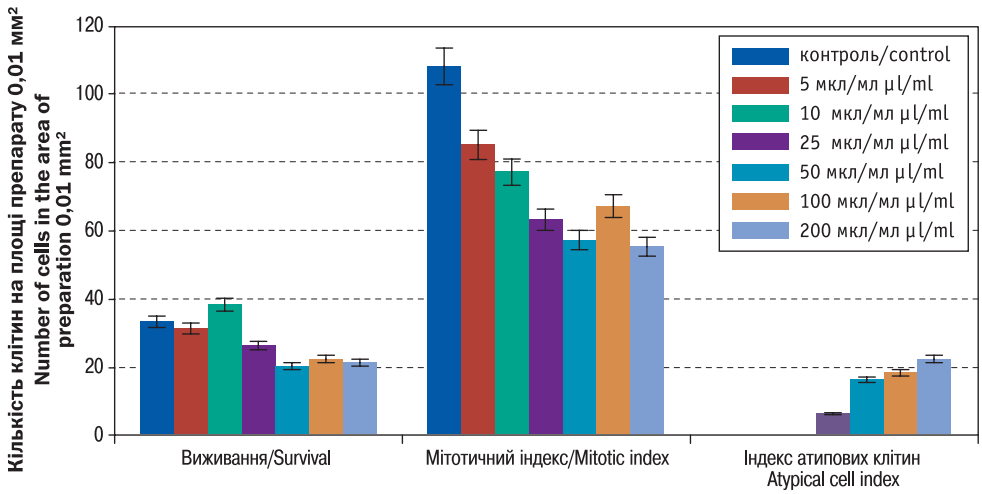

Рисунок 5. Залежність морфофункціональних характеристик нормальних фібробластів людини 6-го пасажу культивування при інкубації з фотосенсибілізатором «Фотолон» у різних концентраціях на 5-ту добу

Figure 5. Dependence of morphofunctional characteristics of normal human fibroblasts (6th passage of cultivation) during incubation with «Photolon» photosensitizer in various concentrations on the 5th day

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2021. Вип. 26.

ності клітинної популяції. Однак, мітотична активність помірно зменшена, у порівнянні з контролем. Водночас, за концентрації 25 мкл/мл і вище проявляється генотоксичний вплив фотосенсибілізатора на нормальні фібробласти людини: в культурі фібробластів з'являються атипові клітини з двома і більше ядрами, з мікроядрами, з ядерними аномаліями, такими як каріорексис, хвостаті ядра, ядра атипової форми, гантелеподібні ядра тощо.

ВИСНОВОК

Основні результати проведеного дослідження полягають у створенні експериментальної моделі *in vitro* для порівняння ефективності впливу нейтронозахватної та фотон-захватної технологій шляхом визначення чутливості злоякісних клітин людини (клітини недрібноклітинного раку легень людини, лінія А-549) та нормальних клітин (перещеплювана культура фібробластів людини) до гадолінійвмісного фотон-захватного агенту «Дотавіст» та фотосенсибілізатора «Фотолон» за морфофункціональними змінами в тест-системах досліджуваних клітинних культур в умовах впливу різних концентрацій застосованих препаратів. Отримані результати за своєю суттю складають підгрунтя доклінічного етапу оцінки ефективності препаратів, що застосовуються у бінарних технологіях.

concentration range. However the mitotic activity was moderately reduced compared to control. At the same time, the genotoxic effect of the photosensitizer at concentration of 25 μl/ml and above on normal human fibroblasts was expressed through the appearance of atypical cells with two or more nuclei, micronuclei, nuclear abnormalities such as karyorrhexis, caudate nuclei, atypical nuclei, dumbbell-shaped nuclei, etc., in the culture of fibroblasts.

CONCLUSION

As the main result of this study the *in vitro* experimental model was created to compare the effectiveness of neutron-capture and photon-capture technologies by determining the sensitivity of the human malignant cells (non-small cell lung cancer cell line A-549) and normal cells (passaged human fibroblast culture) to the gadolinium containing photon-capture «Dotavist» agent and «Photolon» photosensitizer according to the morphofunctional changes in test systems of the studied cell cultures under the influence of different concentrations of drugs used. The obtained results, in essence, form the basis for pre-clinical stage of evaluating the effectiveness of drugs used in binary technologies.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Разработка бинарных технологий лучевой терапии злокачественных новообразований: состояние и проблемы / И. Н. Шейно, П. В. Ижевский, А. А. Липенгольц и др. *Бюллетень сибирской медицины.* 2017. Т. 16 (3). С. 192–209. doi: 10.20538/1682-0363-2017-3-192-209.
2. Шейно И. Н., Ижевский П. В., Липенгольц А. А. Обоснование принципа фотон-захватной терапии злокачественных новообразований. *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2013. Т. 9, № 4. С. 878–881.
3. Эффективность фотон-захватной терапии с использованием золотосодержащих соединений на основе гиалуроновой кислоты (экспериментальные исследования) / С. Н. Корякин, С. Е. Ульяненко, Е. В. Исаева и др. *Радиация и риск.* 2021. Т. 6, № 2. С. 49–61. DOI: 10.21870/0131-3878-2017-26-2-49-61.
4. Лечение опухолей головного мозга методом бор-нейтронзахватной терапии: трудности и современные решения / А. И. Яруллина, В. В. Каныгин, А. И. Кичигин и др. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2015. № 4. С. 6–10.
5. Хмелевський Є. В. Сучасний стан та перспективи нейтронзахватной променевої терапії. URL: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v7/papers/khmelevsky_v7.htm.
6. Борисов Г. И. Теоретические и экспериментальные физические методы нейтронно-захватной терапии. *Физика элементар. частиц и атом. ядра.* 2011. № 5. С. 1371–1479.

REFERENCES

1. Sheino IN, Izhevskiy PV, Lipengolts AA, Kulakov VN, Wagner AR, Sukhikh ES, Varlachev VA. [Development of binary technologies for radiation therapy of malignant neoplasms: state and problems] *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017. 16 (3): 192-209. doi; DOI 10.20538 / 1682-0363-2017-3-192-209. Russian.
2. Sheino IN, Izhevskiy PV, Lipengolts AA [Substantiation of the principle of photon-capture therapy of malignant neoplasm]. *Saratov Journal of Medical Scientific Research.* 2013;9(4):878-81. Russian.
3. Koryakin SN, Ulyanenko SE, Isaeva EV, Beketov EE, Ulyanenko LN, Uspensky SA. et al. [The efficiency of photon-capture therapy using gold-containing compounds based on hyaluronic acid (experimental research)]. *Radiation and risk.* 2021;6(2):49-61. doi: 10.21870 / 0131-3878-2017-26-2-49-61. Russian.
4. Yarullina AI, Kanygin VV, Kichigin AI, Zhdanova MG, Mukhamadiyarov RA, Taskaev SYu. [Treatment of brain tumors by boron neutron capture therapy: difficulties and modern decisions]. *Pacific Medical Journal.* 2015;(4):6-10. Russian.
5. Khmelevsky YeV. [Modern state and the perspectives of neutron capture radiation therapy]. URL: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v7 / papers / khmelevsky_v7.htm. Russian.
6. Borisov GI [Theoretical and experimental physical methods of neutron capture therapy]. *Physics of elementary particles and atom. nucleus.* 2011;(5):1371-1479. Russian.

7. Barth RF, Zhang Z, Liu T. A realistic appraisal of boron neutron capture therapy as a cancer treatment modality. *Cancer Commun (London, England).* 2018. Vol.38, issue 1. Article 36. doi: 10.1186/s40880-018-0280-5
8. Dymova M. A., Taskaev S. Y., Richter V. A., Kuligina E. A. Boron neutron capture therapy: Current status and future perspectives. *Cancer Commun (Lond).* 2020. Vol.40, no 9. P.406–421. doi: 10.1002/cac2.12089
9. From radiation-induced chromosome damage to cell death: Modeling basic mechanisms and applications to boron neutron capture therapy / F. Baltarini, S. Bortolussi, A. M. Clerici et al. *Radiat. Prot. Dosim.* 2011. Vol. 143, no. 2-4. P. 523–527. doi: 10.1093/rpd/ncq466.
10. Таранец Т. А., Сухова Т. Е., Романко Ю. С. ФДТ базально-клеточного рака кожи с локальным и внутривенным использованием фотосенсибилизатора хлоринового ряда «Фотолон». *Альманах клинической медицины.* 2007, Т. 15. С. 283–288.
11. Морфофункциональные характеристики саркомы м-1 крыс после фотодинамической терапии с производным бактериохлорофилла / В. В. Южаков, Н. В. Бурмистрова, Н. К. Фомина и др. *Biomedical Photonics.* 2016. Vol. 5(4). P. 4–14. doi: 10.24931/ 2413-9432-2016-5-4-4-14.
12. Александрова Е. Н., Церковский Д. А., Истомин Ю. П. Противоопухолевая эффективность фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором фотолон в комбинации с цисплатином в эксперименте *in vitro*. *Российский биотерапевтический журнал : материалы конференции «Отечественные противоопухолевые препараты»*. 2016. Т. 15, № 1. С. 5–6.
13. Гамалея Н. Ф., Куценок В. В. Фотодинамическая терапия – эффективный метод лечения больных со злокачественными опухолями. *Doctor*. 2003. № 4. С. 28–31.
14. Эффективность сочетанного применения лучевой и фотодинамической терапии при лечении эпидермоидной карциномы легкого Льюис мышей / И. Ю. Кубасова, З. С. Смирнова, Л. Н. Борисова и др. *Российский биотерапевтический журнал.* 2007. Т. 6, № 1. С. 92–105.
15. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / под общ. ред. Л. П. Дьяконова. М. : «Спутник+», 2009. 656 с.
16. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. 2-е изд. К. : МОРИОН, 2001. 408 с.

7. Barth RF, Zhang Z, Liu T. A realistic appraisal of boron neutron capture therapy as a cancer treatment modality. *Cancer Commun (London, England).* 2018;38(1):36. doi: 10.1186/s40880-018-0280-5
8. Dymova MA, Taskaev SY, Richter VA, Kuligina EA. Boron neutron capture therapy: Current status and future perspectives. *Cancer Commun (Lond).* 2020;40(9):406-21. doi: 10.1002/cac2.12089.
9. Baltarini F, Bortolussi S, Clerici AM, Ferrari C, Protti N, Altieri S. From radiation-induced chromosome damage to cell death: Modeling basic mechanisms and applications to boron neutron capture therapy. *Radiat. Prot. Dosim.* 2011:143(2-4);523-27. doi: 10.1093/rpd/ncq466.
10. Taranets TA, Sukhova TE, Romanko YuS. [PDT of basal cell skin cancer with local and intravenous use of the chlorin series photosensitizer «Photolon»]. *Almanac of Clinical Medicine.* 2007;15:283-288. Russian.
11. Yuzhakov VV, Burmistrova NV, Fomina NK, Bandurko LN. [Morphofunctional characteristics of rat m-1 sarcoma after photodynamic therapy with a bacteriochlorophyll derivative] *Biomedical Photonics.* 2016;5(4):4-14. doi: 10.24931 / 2413-9432-2016-5-4-4-14. Russian.
12. Aleksandrova EN, Tserkovsky DA, Istomin YuP. [Antitumor efficacy of photodynamic therapy with a photosensitizer photolon in combination with cisplatin in an *in vitro* experiment]. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal: materials of the conference «Domestic antineoplastic drugs».* 2016;15(1):5-6. Russian.
13. Gamaleya NF, Kutsenok VV [Photodynamic therapy is an effective method of treating patients with malignant tumors]. *Doctor*. 2003;(4):28-31. Russian.
14. Kubasova IYu, Smirnova ZS, Borisova LN, Kiseleva MP, Vainson AA, Meshcherikova VV et al. [The efficiency of the combined use of radiation and photodynamic therapy in the treatment of epidermoid carcinoma of the lung Lewis mice]. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal.* 2007;6(1):92-105. Russian.
15. [Animal cell in culture (Methods and application in biotechnology)] / ed. LP Dyakonov. M.: «Sputnik +», 2009. 656 p. Russian
16. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN [Statistical methods in biomedical research using Excel]. 2nd ed. K.: MORION, 2001. 408 p. Russian.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Почапінський Олексій Дмитрович, аспірант лабораторії клітинної радіобіології Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ

Лавренчук Галина Йосипівна, доктор біологічних наук, професор, завідувачка лабораторії клітинної радіобіології Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ, ORCID: 0000-0001-7200-712X

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Oleksiy D. Pochapinskyi, graduate student of the Cell Radiobiology Laboratory, Experimental Radiology Institute, State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine», Kyiv

Halyna Yo. Lavrenchuk, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Cellular Radiobiology Laboratory, Experimental Radiology Institute, State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine», Kyiv, ORCID: 0000-0001-7200-712X

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2021. Вип. 26.

Атаманюк Наталія Павлівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник лабораторії клітинної радіобіології Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ
Чернишов Андрій Вікторович, кандидат медичних наук, науковий співробітник лабораторії клітинної радіобіології Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ

Natalia P. Atamaniuk, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher of the Cell Radiobiology Laboratory, Experimental Radiology Institute, State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine», Kyiv
Andriy V. Chernyshov, Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Cell Radiobiology Laboratory, Experimental Radiology Institute, State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine», Kyiv

Стаття надійшла до редакції 15.08.2021 *Received: 15.08.2021*