

УДК 616-006.6:615.849:001.89

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

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

ЕФЕКТИВНІСТЬ ФОТОН-ЗАХВАТНОЇ ПРОМЕНЕВОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ТА ФОТОДИНАМІЧНОГО ВПЛИВУ НА ЗЛОЯКІСНІ ТА НОРМАЛЬНІ КЛІТИНИ ЛЮДИНИ *IN VITRO*

Мета: дослідити структурні та морфофункціональні зміни в тест-системах злоякісних (лінія А-549) та нормальних (стовбурові фібробласти) клітинах людини, опромінених рентгенівськими променями в присутності гадолінійвмісного фотон-захватного агента «Дотавіст» та світла оптичного діапазону (червоне світло) у поєднанні з фотосенсибілізатором «Фотолон».

Методи: метод перещеплюваної культури клітин нормальних фібробластів людини та злоякісних клітин людини, методи опромінення рентгенівськими променями, червоним світлом, цитологічні, статистичні.

Результати. Досліджено у порівняльному аспекті вплив двох бінарних променевих технологій окремо та у поєднанні, а саме: фотон-захватну дію на злоякісні (клітини недрібноклітинного раку легень людини – лінія А-549) та нормальні клітини (стовбурові фібробласти людини) при інкубації їх з гадолінійвмісним фотон-захватним агентом «Дотавіст» та фотодинамічний вплив у присутності фотосенсибілізатора «Фотолон». Встановлено за морфофункціональними характеристиками (кінетика росту, проліферативна та мітотична активність) вищезазначених тест-систем особливості впливу на злоякісні та нормальні клітини. Опромінення рентгенівськими променями в дозах 1,0, 5,0, та 10,0 Гр інактивувало 10, 46 та 80 % злоякісних клітин лінії А-549, відповідно. Опромінення клітин у дозі 1,0 Гр в присутності фотон-захватного агента «Дотавіст» (у концентрації 10 мкл/мл) на 50 % інгібує проліферацію клітин, пригнічуючи їх мітотичну активність, а в дозі 10,0 Гр в присутності «Дотавісту» гальмує на 93 % ріст та поділ злоякісних клітин, що свідчить про високу ефективність даної бінарної променевої технології. Вплив двох бінарних променевих технологій на злоякісні клітини людини лінії А-549, а саме: поєднання червоного світла з «Фотолоном» (у концентрації 0,05 мг/мл) та рентгенівських променів у вищезазначених дозах з «Дотавістом» (у концентрації 10 мкл/мл), призводить до загибелі відповідно 64, 86 та 99 % злоякісних клітин. Встановлено, що культура нормальних фібробластів більш чутлива до впливу комплексу бінарних променевих дій; опромінення в дозі 10,0 Гр у присутності «Дотавісту» та «Фотолону» інактивує 100 % клітин.

Висновок. Отримані результати складають підґрунтя доклінічного етапу оцінки ефективності поєднаної впливу двох бінарних технологій та препаратів, що застосовуються у фотон-захватній технології та фотодинамічній терапії, - фотон-захватного агента «Дотавіст» та фотосенсибілізатора «Фотолон», відповідно.

Ключові слова: культура злоякісних клітин людини, культура фібробластів людини, проліферація, рентгенівське опромінення, фотон-захватний агент, червоне світло, фотосенсибілізатор.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2022. Вип. 27. С. 234–248. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-234-248

✉ Талько Вікторія Василівна, e-mail talko1950@gmail.com

V. V. Talko✉, G. Y. Lavrenchuk, O. D. Pochapinskyi, N. P. Atamanuk, A. V. Chernyshov

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

EFFICIENCY OF PHOTON CAPTURE BEAM TECHNOLOGY AND PHOTODYNAMIC IMPACT ON MALIGNANT AND NORMAL HUMAN CELLS *IN VITRO*

Objective: to investigate the structural and morphofunctional changes in test systems of malignant (cell line A-549) and normal (stem fibroblasts) human cells exposed to X-rays in the presence of gadolinium-containing photon capture agent «Dotavist» and optical light (red spectrum) in combination with «Fotolon» photosensitizer.

Methods. The continuous cell culture of normal human fibroblasts and malignant human cells technology, X-ray and red light exposure, cytological and statistical methods.

Results. Effects of the two binary radiation technologies, namely the photon capture impact on malignant cells (human non-small cell lung cancer cells i.e. line A-549) and normal cells (human stem fibroblasts) when incubated with gadolinium-containing photon capture agent «Dotavist» and photodynamic effect in the presence of «Fotolon» photosensitizer applied separately and in combination were studied in a comparative mode. Proceeding from morphofunctional characteristics (growth kinetics, proliferative and mitotic activity) of the above-mentioned test systems, peculiarities of the effect on malignant and normal cells were established. Irradiation with X-rays to the 1.0, 5.0, and 10.0 Gy doses resulted in inactivation of respectively 10 %, 46 %, and 80% of the A-549 line malignant cells. Cellular irradiation to a 1.0 Gy dose in the presence of the photon capture agent «Dotavist» (10 µl/ml concentration) inhibited cell proliferation by 50 %, suppressing their mitotic activity. At a dose of 10.0 Gy in the presence of «Dotavist» the inhibition by 93 % of the growth and division of malignant cells occurred, indicating the high efficiency of binary radiation technology. The effect of two binary radiation technologies on malignant human cells (A-549 line), namely the combination of red light with «Fotolon» (0.05 mg/ml concentration) and X-ray exposure in the above doses with «Dotavist» (10 µl/ml concentration) resulted in the death of respectively 64 %, 86 %, and 99 % malignant cells. The culture of normal fibroblasts was found being more sensitive to the influence of a complex of binary radiation impact, as exposure to a dose of 10.0 Gy in the presence of «Dotavist» and «Fotolon» inactivated 100 % of cells.

Conclusion. The obtained results provide basis of preclinical evaluation of effectiveness of the combined impact of two binary technologies and drugs used in the photon capture technology and photodynamic therapy i.e. the photon capture agent «Dotavist» and «Fotolon» photosensitizer respectively.

Key words: culture of human malignant cells, culture of human fibroblasts, proliferation, X-ray irradiation, photon capture agent, red light, photosensitizer.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2022;27:234-248. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-234-248

ВСТУП

Променева терапія (ПТ) є одним з основних методів лікування пацієнтів з онкологічними захворюваннями. Дистанційні джерела γ -випромінювання та прискорювачі електронів, що використовуються у клінічній практиці, досягли практично межі свого технічного розвитку і дозволяють націлювати іонізуюче випромінювання (ІВ) на пухлину з дуже високим ступенем вибіркової та конформності [1]. Водночас серйозним обмеженням застосування радикальної дистанційної ПТ у клінічній практиці є надмірно високе променеве навантаження на нормальні тканини

INTRODUCTION

Radiation therapy (RT) is one of the essential methods of treatment in cancer patients. Distant γ -radiation sources and electron accelerators used in clinical practice have practically reached the limit of their technical development and allow targeting of ionizing radiation (IR) to the tumor with a very high degree of selectivity and conformity [1]. At the same time, a serious limitation of the use of definitive distant RT in clinical practice is the excessively high radiation burden on normal body tissues when trying to enhance the

✉ Victoria V. Talko, e-mail talko1950@gmail.com

організму при спробах збільшення терапевтичної ефективності за рахунок ескалації дози опромінення пухлини. Одним із шляхів підвищення ефективності ПТ є розробка та впровадження в клінічну практику бінарної променевої терапії (БПТ) – технології лікування злоякісних новоутворень за допомогою ІВ, в якій для забезпечення протипухлинного ефекту використовуються два компоненти – препарат, що вводиться в організм, і зовнішнє джерело ІВ [2]. На відміну від ПТ з використанням препаратів–радіомодифікаторів, здатних змінювати радіочутливість пухлинних тканин, у БПТ використовуються препарати, що не мають вираженої біологічної активності у дозах, що застосовуються. Такі препарати повинні мати у своєму складі один або кілька хімічних елементів, здатних взаємодіяти із зовнішнім ІВ зі значно більшою ймовірністю, ніж елементи, що входять до складу нормальних тканин [3].

Насьогодні до БПТ належать дві технології: нейтрон-захватна (НЗТ) та фотон-захватна (ФЗТ) терапія. Їх об'єднує загальний принцип, – реалізація ефекту безпосередньо в мішені, що опромінюється, за рахунок фізичних процесів, які призводять до виділення додаткової енергії безпосередньо в пухлинній тканині. При тому пухлинні клітини гинуть, а нормальні не отримують зайвого променевого навантаження. Незважаючи на те, що принципи обох технологій було запропоновано понад 30 років тому, НЗТ суттєво випередила ФЗТ у своєму розвитку [4–6]. Новий поштовх для розробки нових ліків і технологій лікування з використанням НЗТ надала розробка нових прискорювачів [7, 8].

Необхідно відзначити, що роботи зі створення технології та впровадження ФЗТ розпочато в останні роки і набуло поширення в усьому світі [9, 10]. Інтерес до нового виду ПТ обумовлений необхідністю розробки нових ефективних методів, нижчих за вартістю у порівнянні з джерелами електронів, гамма-випромінювання, джерел протонів, нейтронів та іонів вуглецю, вартістю апаратури, її мобільністю і можливістю масового застосування в медичних установах.

На даний момент є лише два препарати, для яких ФЗТ є однією з основних областей їх застосування: препарат AGuIX (NH TherAguix, Франція), в якому використаний гадоліній як допоміжний агент [11, 12], та препарат NBTXR3 (Nanobiotix, Франція) на основі гафнію, призначений для інтратуморального введення [13]. Обидва препарати знаходяться на I фазі клінічних випробувань.

У більшості експериментальних досліджень ФЗТ використовують лікарські засоби та сполуки наступних

therapeutic efficiency through the increase of radiation dose to the tumor. One of the ways to improve the RT effectiveness is to develop and implement in clinical practice the binary radiation therapy (BRT) i.e. a technology of cancer radiotherapy where antitumor effect is received through the administration of a drug injected into the body and use of external IR source [2]. In contrast to RT with the use of drugs-radiomodifiers capable of changing the tumor tissue radiosensitivity, drugs with no pronounced biological activity in therapeutic doses are used in BRT. Such drugs should contain one or more chemical elements capable of interacting with external IR with a much higher probability than elements in composition of normal tissues [3].

Nowadays the BRT includes two technologies - the neutron capture therapy (NCT) and photon capture therapy (PCT). They share a common principle of the effect realization directly in the irradiated target due to physical processes leading to release of additional energy directly in the tumor tissue. At that the tumor cells die, while normal ones receive no excessive radiation exposure. Despite the fact that principles of both technologies were proposed more than 30 years ago, NCT is significantly ahead of PCT in its development [4–6]. New impulse for the development of new drugs and treatment technologies using NCT emerged due the development of next-generation accelerators [7, 8].

It should be noted that elaboration of the PCT technology and its implementation has started in recent years and is becoming widespread worldwide [9, 10]. Interest in a new type of RT is because new effective treatment tools are required, being lower in cost compared to sources of electrons, gamma radiation, protons, neutrons, and carbon ions, both with lower cost of equipment, good mobility and possibility of extensive use in healthcare institutions.

At the moment, there are only two drugs for which FCT is a principle areas of their application i.e. AGuIX (NH TherAguix, France) in which gadolinium is used as an auxiliary agent [11, 12] and NBTXR3 (Nanobiotix, France) for intratumoral administration based on hafnium [13]. The phase I clinical trials are going on with both drugs.

Drugs and compounds of the following types are used in the majority of experimental studies with PCT: the contrast drugs for X-ray and computed

типів: контрастні лікарські засоби для рентгенівської та магнітно-резонансної комп'ютерної томографії на основі йоду та гадолінію [14]; потенційні чи явні цитостатики з урахуванням сполук платини (цисплатин, карбоплатин) [15]; функціоналізовані наночастинки металів [16, 17]. Очевидними є наступні вимоги, що визначають вибір сполук для ФЗТ: наявність у складі лікарської речовини хімічного елемента з $Z > 52$, що добре поглинає фотони; масовий вміст поглинаючого елемента в лікарській речовині, його токсичність та фармакологічні властивості повинні бути такими, щоб забезпечити в пухлинній мішені значущу для ФЗТ терапевтичну концентрацію впродовж часу, необхідного для проведення сеансу опромінення.

До переваг ФЗТ, у порівнянні з традиційними методами ПТ, належить те, що підведення необхідної терапевтичної дози до біологічної мішені (пухлини) здійснюється створенням певної концентрації препарату, а не націлюванням і фокусуванням пучка випромінювань.

Метод ФЗТ використовує більш доступні фотонні джерела випромінювань, є більш перспективним і обумовлений необхідністю розробки нових і ефективних методів ПТ з порівняно низькою вартістю опромінювальної апаратури, можливістю її масового застосування в медичних установах.

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 [9, 10].

Підвищення ефективності протипухлинної дії при поєднанні променевої та фотодинамічної терапії показано на експериментальних моделях різних пухлин у миші [18, 19]. Використання культури клітин у дослідженнях біологічних ефектів фотосенсибілізаторів за умов поєднання ФДТ та ФЗТ (впливу світлового та ІВ) має провідне значення для розкриття механізмів їх сполучної дії [20, 21]. Для якнайшвидшого впровадження даного методу в клінічну практику з метою подолання радіорезистентних та інвазивних ракових захворювань потрібно здійснити комплекс досліджень і розробок відповідно до вимог проведення доклінічних досліджень.

МЕТА

Дослідити структурні та морфофункціональні зміни в тест-системах злоякісних (лінія А-549) та нормальних (стовбурові фібробласти) клітинах людини, опромінених рентгенівськими променями в присутності

magnetic resonance imaging based on iodine and gadolinium [14], potential or approved cytostatics including platinum compounds (cisplatin, carboplatin) [15], and also the functionalized metal nanoparticles [16, 17]. The following requirements determine choice of compounds for the PCT: presence of a chemical element with $Z > 52$ that absorbs photons well in the content of medicinal substance, mass content of absorbing element in medicinal substance, its toxicity and pharmacological properties that provide a therapeutic concentration significant for PCT in the tumor target during the time required for irradiation session.

Advantages of PCT compared to the traditional RT methods feature the fact that delivery of required therapeutic dose to biological target (tumor) is achieved by creating a certain concentration of the drug, but not by targeting and focusing the radiation beam.

The more accessible photonic sources of radiation are used in PCT, it is more promising and had emerged due to the need in new and effective RT methods with relatively low cost of irradiation equipment, and possibility of its wide application in healthcare institutions.

PDT method, which combines the capabilities of modern pharmacology and achievements of quantum electronics, is successfully implemented in the innovative cancer clinics worldwide and is an effective alternative to existing methods of cancer treatment [9, 10].

Increased antitumor effect when radiation and photodynamic therapy are combined has been shown on experimental models of various tumors in mice [18, 19]. The use of cell culture in studies of biological effects of photosensitizers under the PDT and PCT (influence of light and IR) combination is of a leading value for revealing the mechanisms of their combined action [20, 21]. In order to introduce this method into clinical practice as soon as possible to overcome the radioresistant and invasive cancers, it is necessary to carry out a complex of research and development according with the requirements of preclinical studies' conduction.

OBJECTIVE

To investigate structural and morphofunctional changes in test systems of malignant (line A-549) and normal (stem fibroblasts) human cells exposed to X-rays in the presence of gadolinium-contain-

гадолінійвмісного фотон-захватного агента «Дотавіст» та світла оптичного діапазону (червоне світло) у поєднанні з фотосенсибілізатором «Фотолон».

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження виконані на перещеплюваній моношаровій культурі клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії A-549, що походять з карциноми легень людини, епітеліоподібної морфології, наданих Банком клітинних культур ІЕПОР НАН України, та проліферуючих стовбурових фібробластах людини.

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 [20]. Клітини вирощували при постійній температурі 37 °C та 5 % CO₂ на покривних скельцях розмірами (16×8) 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 стовбурових фібробластів людини 6-го пасажу. Клітини вирощували при постійній температурі 37°C та 5 % CO₂ на покривних скельцях розмірами (16×8) 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 10 мкл/мл поживного середовища і культивували впродовж 5 діб. Через 1 год культури клітин опромінювали рентгенівськими променями на апараті РУМ-17 при напрузі на трубі 180 кВ, силі струму 15 мА, фільтрах 2,5 мм Cu + 1 мм Al, потужності дози 1,47 Гр/хв, в дозах від 1,0 Гр до 10,0 Гр і фокусній відстані 40 мм та/або світлом червоного діапазону на апараті «Барва-LED/630» (одиничний світлодіод і площа світлового потоку відповідає площі дна пляшечки, на якому ростуть клітини) у дозі 45 Дж/см² (25 мВт/см² за 30 хв).

Морфофункціональні характеристики культури клітин оцінювали у різні терміни культивування клітин за показниками життєздатності: проліфера-

ing photon capture agent «Dotavist» and optical light (red spectrum) in combination with «Fotolon» photosensitizer.

MATERIALS AND METHODS

The studies were performed on a continuous monolayer culture of human non-small cell lung cancer cell line A-549, derived from human lung carcinoma of epithelial-like morphology, provided by the Bank of Cell Cultures of the Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology (IEPOR) of the NAS of Ukraine, and proliferating human stem fibroblasts.

Cells were cultured in the complete nutrient medium Advanced DMEM F/12 (GIBCO) containing 2 % fetal calf serum (GIBCO), Pen Strep Glutamine (GIBCO) in accordance to the standard cell strain methods [20]. Cells were grown at a constant temperature of 37 °C and 5 % CO₂ on coverslips 16×8 mm size, placed on the bottom of glass bottles, until the confluent state of monolayer was achieved (1–5 days). To study the kinetics of cell culture growth, cells were incubated for 5 days, morphological preparations were prepared every 24 hours according to the generally accepted method (3 preparations per point).

Continuous culture of human stem fibroblasts of the 6th passage was chosen as a test system of normal cells. Cells were grown at a constant temperature of 37 °C and 5 % CO₂ on coverslips 16×8 mm size, placed on the bottom of glass bottles, until the confluent state of monolayer was achieved (1–5 days). To study the growth kinetics, cell cultures were incubated for 5 days, morphological preparations were prepared every 24 hours according to the generally accepted method.

«Fotolon» and «Dotavist» agents were added to the cultures 24 hours after planting in concentrations of 10 µl/ml of nutrient medium with cultivation for 5 days. After 1 hour, cell cultures were irradiated with X-rays on the RUM-17 device at the tube voltage of 180 kV, 15 mA current, 2.5 mm Cu + 1 mm Al filters, 1.47 Gy/min dose rate, 1.0 Gy to 10.0 Gy doses, and a focal distance of 40 mm and/or red light on the Barva-LED/630 device at a dose of 45 J/cm² (25 mW/cm² in 30 min) from a single LED and with light stream corresponding to the area of bottle bottom where the cells grow).

Morphofunctional characteristics of cell culture were evaluated at different times of cell cultivation according to the viability indicators i.e. proliferative

тивна і мітотична активність. 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 у 1000 разів у межах сітки методом випадкових полів за С. Б. Стефановим підраховували загальну кількість клітин, кількість мітозів. Мітотичний індекс 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 [22].

При виконанні експериментальних досліджень було проаналізовано 2005 препаратів культур клітин.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Досліджено у порівняльному аспекті вплив двох бінарних променевих технологій окремо та у поєднанні, а саме: фотон-захватної дії на злоякісні (клітини недрібноклітинного раку легень людини – лінія А-549) та нормальні клітини (стовбурові фібробласти людини) при інкубації їх з гадоліній-вмісним фотон-захватним агентом «Дотавіст» та фотодинамічний вплив у присутності фотосенсибілізатора «Фотолон»

Вивчені структурні та морфо-функціональні характеристики злоякісних та нормальних клітин людини в культурі за умов впливу 1) рентгенівського опромінення та фотон-захватного агента «Дотавіст»; 2) світла червоного діапазону та фотосенсибілізатора «Фотолон»; 3) рентгенівського опромінення та фотон-захватного агента «Дотавіст» у поєднанні зі світлом червоного діапазону та фотосенсибілізатором «Фотолон».

Кінетика росту та структури популяції у культурі інтактних клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії А-549 (контроль), досліджувана впродовж 5-ти діб, характеризується двома фазами. Лаг-фаза триває 1–2 доби, впродовж якої клітини прикріплюються до субстрату, розпластовуються і запускають процес поділу при низькому мітотичному індексі. Фаза логарифмічного росту триває 2–5 діб, впродовж яких відбувається інтенсивне збільшення кількості клітин за рахунок підвищення мітотичної активності клітин у культурі та зростання щільності клітинної популяції, конфлуент культури становить

and mitotic activity. The proliferative activity of cells was assessed by growth kinetics. Preparations were prepared daily for five days: they were fixed with 96° ethanol and stained with hematoxylin-eosin. Preparations with stained cells were pasted with Canadian balsam on a glass slide. The total number of cells and number of mitoses were counted under the optical microscope «Axioscop» (West Germany) at a $\times 1000$ magnification within margins of grid using the random fields method according to S. B. Stefanov. The mitotic index was calculated per 1000 cells (%).

Statistical analysis of the obtained data was carried out by means of the Student's *t*-test, using the Microsoft Excel and Biostat software with a preliminary test of the hypothesis about normal distribution of random variables according to the Kolmogorov-Smirnov test [22].

The 2,005 preparations of cell cultures were analyzed.

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of two binary radiation technologies applied separately and in combination were investigated with a comparative approach, namely the photon capture effect on malignant (human non-small cell lung cancer cells - the A-549 line) and normal cells (human stem fibroblasts) when incubated with gadolinium-containing photon capture agent «Dotavist» and photodynamic effect in the presence of «Fotolon» photosensitizer.

The structural and morpho-functional characteristics of malignant and normal human cells in culture were studied under the conditions of exposure to 1) X-ray irradiation and the photon-capturing agent «Dotavist», 2) red spectrum optical light and «Fotolon» photosensitizer, and 3) X-ray irradiation and photon capture agent «Dotavist» in combination with red spectrum optical light and «Fotolon» photosensitizer.

Kinetics of growth and population structure in the culture of intact cells of human non-small cell lung cancer A-549 line (control) studied over 5 days was characterized by two phases. The lag phase lasted 1–2 days, during which the cells were attaching to substrate, flatten out and start to divide at a low mitotic index. The phase of logarithmic growth lasted 2–5 days, during which there was an intensive increase in cell number due to amplified mitotic activity of cells in the culture and increased density of cellular population. The confluent of culture was 80 %. On the 5th–6th day

80 %. На 5–6-ту добу мітотичний індекс та щільність клітинної популяції зменшується. У культурі інтактних клітин спостерігається надзвичайно мало атипичних клітин: багатоядерних, з мікроядрами, апоптотичних. Кінетика росту стовбурових фібробластів людини була подібною. Цінність таких культуральних моделей полягає у незмінності кінетики росту при перещепленні, що вкрай важливо для повторюваності результатів за різних умов.

Для вивчення фотон-захватної дії ІВ на життєздатність клітин лінії А-549 було обрано рентгенівське опромінення в дозах 1,0; 5,0; 10 Гр, що призвело до загибелі 10, 46 та 80 % злоякісних клітин, відповідно дозі опромінення (рис. 1).

Вибір препарату «Дотавіст» в якості фотон-захватного 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). Гадотерова кислота не має специфічної фармакодинамічної активності та є біологічно високоінертною. Використовується виключно з діагностичною метою, якщо застосування МРТ без контрастного підсилення неможливе.

Дослідження меж чутливості злоякісних та нормальних клітин людини щодо фотон-захватних агентів *in vitro* дозволили визначити оптимальну концентрацію препарату «Дотавіст» з максимальним цитотоксичним та мінімальним генотоксичним ефектом [23].

Для вивчення клітинних реакцій при використанні препарату «Дотавіст» у ФЗТ застосовано концентрацію 10 мкл/мл, що відповідає 2,97 мг гадотерової кислоти на 1 мл поживного середовища (рис. 1).

Встановлено, що в присутності фотон-захватного агента опромінення клітин рентгенівськими променями у дозі 1,0 Гр на 50 % інгібує проліферацію

the mitotic index and density of cell population has decreased. In the culture of intact cells, extremely few atypical, i.e. multinucleated, with micronuclei, apoptotic cells were observed. The growth kinetics of human stem fibroblasts was similar. The value of such cultural models lies in the invariance of growth kinetics during passage, which is extremely important for repeatability of results under different conditions.

X-ray irradiation in 1.0, 5.0, and 10 Gy doses was chosen to study the photon-capturing effect of IR on viability of cells of the A-549 line. As a result the death of 10 %, 46 %, and 80% of malignant cells occurred, according to the radiation dose (Fig. 1).

The «Dotavist» drug was chosen as a photon-capturing agent due to the gadolinium in its composition, which is critical for the photon capture therapy. «Dotavist» is the gadoteric acid with paramagnetic properties capable to enhance the contrast in magnetic resonance imaging (MRI). Gadoteric acid has no specific pharmacodynamic activity and is biologically highly inert. It is used exclusively for diagnostic purposes when MRI without contrast enhancement is inappropriate.

Studies of the sensitivity of malignant and normal human cells to photon capture agents *in vitro* made it possible to determine the optimal concentration of «Dotavist» drug with the maximum cytotoxic and minimum genotoxic effects [23].

«Dotavist» at a concentration of 10 µl/ml, corresponding to 2.97 mg of gadoteric acid per 1 ml of nutrient medium, was used to study cellular reactions in PCT (Fig. 1).

It was established that in the presence of a photon capture agent, irradiation of cells with X-rays at a 1.0 Gy dose inhibited the cell proliferation by 50%, suppressing their mitotic activity, and at a

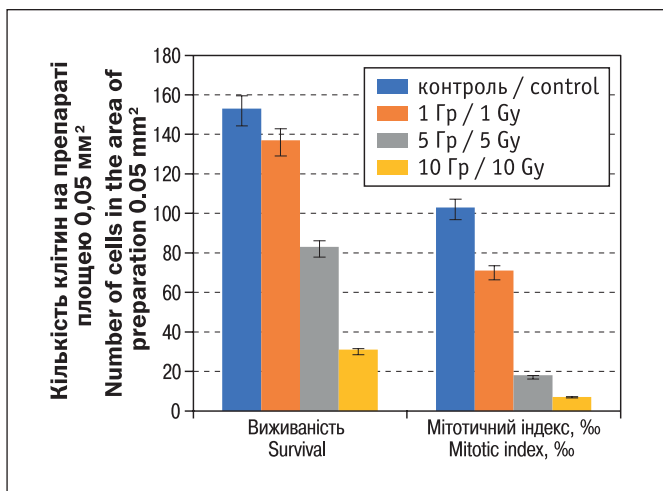


Рисунок 1. Дозова залежність життєздатності клітин лінії А-549, опромінені рентгенівськими променями, на 6-ту добу культивування

Figure 1. Dose dependence of viability of the A-549 line cells on the 6th day of cultivation upon exposure to X-rays

клітин, пригнічуючи їх мітотичну активність, а в дозі 10,0 Гр гальмує на 93 % ріст та поділ злоякісних клітин, що свідчить про високу ефективність даної бінарної променевої технології. Щодо структурних змін культури клітин лінії А-549, слід відмітити, що при дії тільки «Дотавісту», щільність клітинної популяції майже не відрізняється від контролю, окрім присутності в культурі клітин незначної кількості двоядерних клітин. За цієї концентрації форма клітин незмінна, ядро центроване, цитоплазма містить дрібні вакуолі.

Опромінення рентгенівськими променями в присутності «Дотавісту» призводить до зміни структури моношару за рахунок загибелі клітин, пригнічення мітотичної активності, появи атипичних клітин (клітин з мікроядрами, апоптотичних клітин, зрідка багатоядерних, які можуть слугувати резервом для відновлення пухлини).

Досліджували клітинні реакції в умовах впливу на злоякісні клітини А-549 червоного світла окремо та у поєднанні з фотосенсибілізатором «Фотолон» в концентрації 0,05 мг/мл, що не викликає видимих змін в популяції клітин, з наступним опроміненням рентгенівськими променями в дозах 1,0; 5,0; 10,0 Гр (рис. 2).

Відомо, що активна речовина фотосенсибілізатора «Фотолон» хлорин Е6 вибірково накопичується у патологічній тканині (доброякісні та злоякісні новоутворення різного генезу і локалізації) і при локальному впливі світла з довжиною хвиль 630–670 нм (червоне світло) забезпечує фотосенсибілізуючий ефект, який призводить до пошкодження пухлинної тканини. Опромінення клітин в присутності «Фотолону» зменшує виживаність та мітотичну активність злоякісних клітин на 34 % відносно ефектів впливу тільки червоного світла. Поєднана дія червоного світла з фотосенсибілізатором та рентгенівських променів в дозах від

dose of 10.0 Gy inhibited the growth and division of malignant cells by 93%, which indicated the high efficiency of this binary beam technology. Regarding structural changes in the A-549 line cell culture it should be noted that under the action of «Dotavist» alone the density of cell population barely differed from control, except for the presence of a small number of binucleated cells in the cell culture. At this concentration the cell shapes were unchanged, nuclei were centered, and cytoplasm contained small vacuoles.

Irradiation with X-rays in the presence of «Dotavist» lead to a change in monolayer structure due to cell death, inhibition of mitotic activity, appearance of atypical cells, namely cells with micronuclei, apoptotic cells, sometimes multinucleated, which can serve as a reserve for tumor recovery.

Cell reactions were studied under conditions of exposure of malignant A-549 cells to the red light alone and in combination with added «Fotolon» photosensitizer at 0.05 mg/ml concentration, which did not cause visible changes in cell population, followed by exposure to X-rays in 1.0, 5.0, and 10.0 Gy doses (Fig. 2).

It is known that chlorin E6, the active substance of «Photolon» photosensitizer is selectively accumulated in abnormal tissues (benign and malignant neoplasms of various origin and localization) and upon local exposure to light with a wavelength of 630–670 nm (red spectrum) provides a photosensitizing effect that leads to damage of tumor tissue. Irradiation of cells in the presence of «Photolon» reduces the survival and mitotic activity of malignant cells by 34% compared to the effects of exposure to red light alone. The combined effect of red light with photosensitizer and X-ray exposure in 1.0 Gy to

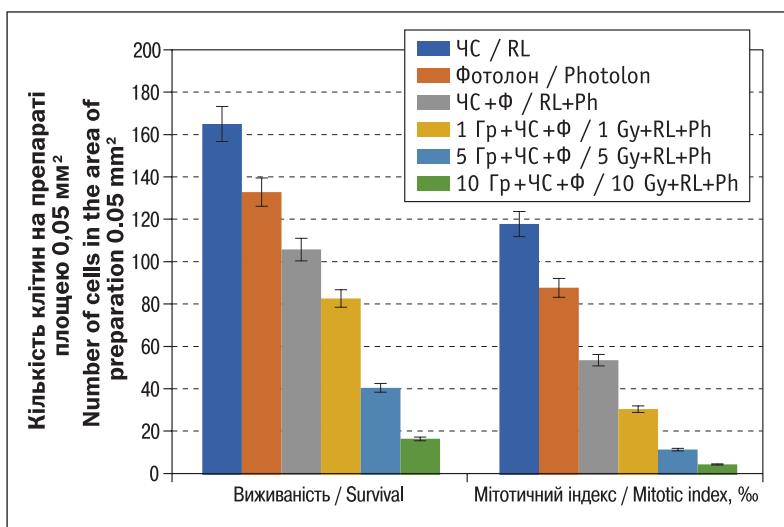


Рисунок 2. Виживаність та мітотична активність злоякісних клітин А-549 в умовах впливу червоного світла (ЧС), фотосенсибілізатора «Фотолон» (Ф) окремо та у поєднанні з опроміненням рентгенівськими променями в дозах 1,0, 5,0 та 10,0 Гр

Figure 2. Survival and mitotic activity of malignant cells A-549 under conditions of exposure to red light (CR), photosensitizer «Fotolon» (F) separately and in combination with X-ray irradiation at doses of 1.0, 5.0, and 10.0 Gy

1,0 Гр до 10,0 Гр пригнічує проліферацію клітин А-549 на 50 та 90 %, знижує мітотичну активність до 4 % відносно ефектів тільки червоного світла.

Застосування двох БПТ, — поєднання червоного світла з «Фотолоном» (у концентрації 0,05 мг/мл) та рентгенівського опромінення у дозах 1,0; 5,0; 10,0 Гр з «Дотавістом» (у концентрації 10 мкл/мл) призвело до загибелі 64, 86 та 99 % злоякісних клітин, відповідно (рис. 3).

Результати досліджу засвідчили, що перещеплювана моношарова культура клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії А-549, що походять з карциноми легень людини, епітеліоподібної морфології є досить стійкими до різних варіантів бінарних променевих впливів. 1 % клітин, що вижили, можуть дати рецидивування первинної пухлини. Це можуть бути клітини, що знаходяться у спокої, а також поліплоїдні клітини, що виникають в пухлині у великій кількості за несприятливих умов росту.

При фотон-захватній терапії клітин пухлини дуже важливо зберегти баланс між опроміненням максимального об'єму тканини пухлини та якнайменшої частини нормальних клітин, які у подальшому заповнять місце пухлини. З попередніх досліджень цитотоксичного впливу препарату «Дотавіст» на нормальні фібробласти у діапазоні концентрацій від 5 до 200 мкл/мл визначено, що зменшення щільності клітинної популяції фібробластів на 50 % відбувалося за концентрації 50 мкл/мл і вище, мітотичний індекс статистично достовірно зменшувався за цих же концентрацій [23]. Слід зазначити, що за концентрацій гадолінійвмісного препарату 100 і 200 мкл/мл у культурі клітин виявляється значна кількість атипичних клітин, а саме: клітин зі зміненою формою і кількістю ядер, з мікроядрами, з ознаками апоптозу, тобто

10.0 Gy doses suppressed the proliferation of A-549 cells by 50 % and 90 %, and reduces mitotic activity to 4% vs. effects of red light alone.

The use of two BRT i.e. a combination of red light exposure with «Fotolon» (0.05 mg/ml concentration) and X-ray irradiation in 1.0, 5.0, and 10.0 Gy doses with «Dotavist» (10 µl/ml concentration) led to the death of 64 %, 86 %, and 99% of malignant cells, respectively (Fig. 3).

Results of the experiment proved that the passaging monolayer culture of human non-small cell lung cancer of A-549 line cells, originated from human lung carcinoma and featuring an epithelial-like morphology, are quite resistant to various options of binary radiation exposure. The 1 % of the survived cells can give a recurrence of primary tumor. These can be cells that are at rest, as well as polyploid cells that arise in tumor in large numbers under the unfavorable growth conditions.

In photon-capture therapy of tumor cells, it is very important to maintain a balance between irradiation of the maximum volume of tumor tissue and the smallest possible part of normal cells that will later fill the tumor site. In the previous studies of cytotoxic effect of «Dotavist» drug on normal fibroblasts in concentration range from 5 to 200 µl/ml a decrease in the density of cell population of fibroblasts by 50% occurred at concentrations of 50 µl/ml and higher. Mitotic index was statistically significantly reduced at these same concentrations [23]. It should be noted that at concentrations of the gadolinium-containing drug of 100 and 200 µl/ml in the cell culture, a significant number of atypical cells was detected, namely cells with a changed shape and number of

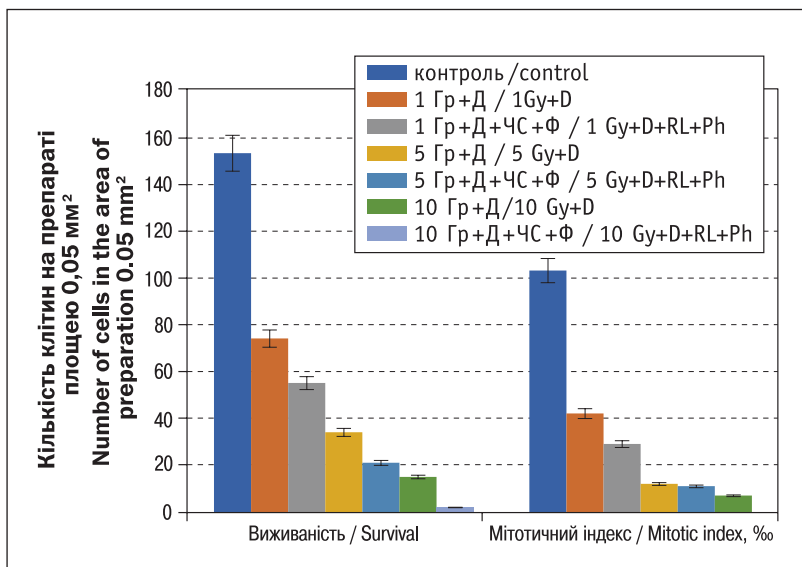


Рисунок 3. Морфофункціональні зміни в культурі злоякісних клітин А-549 в умовах впливу фотон-захватної терапії з «Дотавістом» у поєднанні з фотодинамічною дією з фотосенсибілізатором «Фотолон».

Figure 3. Morphofunctional changes in the culture of malignant A-549 cells under the influence of photon capture therapy with «Dotavist» in combination with photodynamic action with the photosensitizer «Photolon»

генетично нестабільних клітин. Це опосередковано вказує на вплив препарату «Дотавіст» на поділ та генетично нормальних фібробластів.

Отже, згідно з результатами експериментального дослідження цитотоксичності препарату «Дотавіст» для вивчення фотон-захватного впливу на нормальні фібробласти людини була застосована концентрація препарату 10 мкл/мл у ростовому середовищі, що відповідає 2,97 мг гадотерової кислоти на 1 мл поживного середовища (аналогічно з експериментом на клітинах А-549) і не має інактивуючого впливу на нормальні клітини.

Рентгенівське опромінення фібробластів в дозах 1,0, 5,0 та 10,0 Гр зменшує виживаність клітин на 10, 50 та 80 %, відповідно (рис. 4).

За умов опромінення нормальних клітин рентгенівськими променями у вищезазначених дозах в присутності препарату «Дотавіст» в концентрації 2,97 мг/мл поживного середовища встановлено, що виживаність клітин і їх мітотична активність знижується майже на 50 % після опромінення в дозі 1,0 Гр і на 90 % після опромінення в дозі 10,0 Гр, що свідчить про радіочутливість нормальних проліферуючих клітин, якими є стовбурові клітини, та ефективність фотон-захватної терапії (рис. 5). Водночас, 10 % клітин, що вижили, можуть здійснювати репопуляцію клітин і відновлювати ушкоджені радіацією нормальні тканини.

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

nuclei, with micronuclei, with signs of apoptosis, that are genetically unstable cells. This indirectly indicated the influence of the drug «Dotavist» on division and genome of normal fibroblasts.

Therefore, according to the results of assessment of the drug «Dotavist» cytotoxicity within study of the photon capture effect on normal human fibroblasts, a drug concentration of 10 μ l/ml was used in the growth medium, which corresponded to 2.97 mg of gadoteric acid per 1 ml of nutrient medium (similarly with experiment on A-549 cells) and had no inactivating effect on normal cells.

X-ray irradiation of fibroblasts to 1.0, 5.0, and 10.0 Gy doses has reduced the cell survival by 10 %, 50 %, and 80%, respectively (Fig. 4).

Under the conditions of irradiation of normal cells with X-rays to the above doses in the presence of «Dotavist» drug in a concentration of 2.97 mg/ml of nutrient medium, the survival of cells and their mitotic activity decreased by almost 50 % after irradiation to a dose of 1.0 Gy and by 90 % upon exposure to a dose of 10.0 Gy, which indicated the radiosensitivity of normal proliferating cells, which are stem cells, and the effectiveness of photon capture therapy (Fig. 5). At the same time, 10 % of surviving cells can repopulate cells and restore normal tissue damaged by radiation.

It should be noted that normal proliferating fibroblasts had almost similar radiosensitivity and, accordingly, cellular response to X-ray irradiation and «Dotavist» drug supplementation, as malignant proliferating cells of the A-549 line. Such biological effects should be kept in mind when considering the role of stem cells in restoration of both normal tissues (repopulation) and tumor tissues (recurrence).

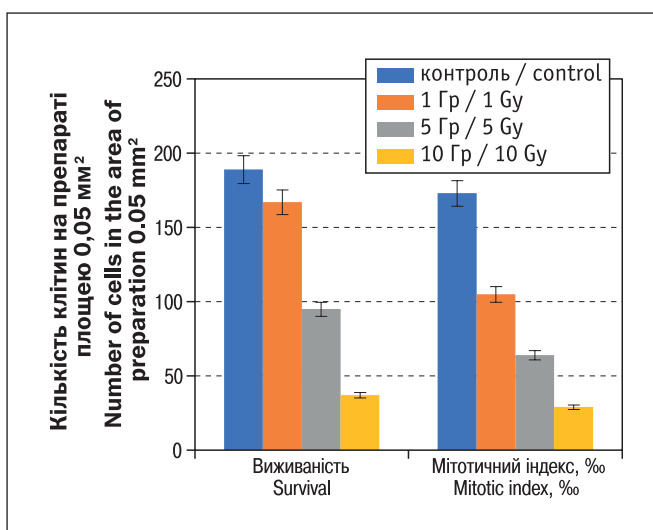


Рисунок 4. Дозова залежність життєздатності нормальних фібробластів, опромінених рентгенівськими променями, на 6-ту добу культивування

Figure 4. Dose dependence of the viability of normal fibroblasts on the 6th day of cultivation upon X-ray irradiation

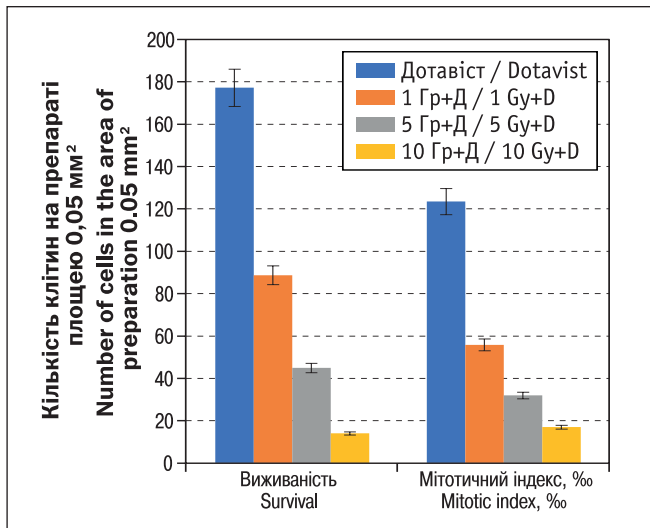


Рисунок 5. Дозова залежність життєздатності нормальних фіброblastів людини, опромінені рентгенівськими променями у різних дозах в присутності препарату «Дотавіст» в концентрації 2,97 мг/мл поживного середовища на 6-ту добу культивування

Figure 5. Dose dependence of viability of normal human fibroblasts on the 6th day of cultivation upon X-ray irradiation to different doses in the presence of «Dotavist» drug at a concentration of 2.97 mg/ml of nutrient medium

Метод фотодинамічної терапії 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.

Встановлено, що опромінення рентгенівськими променями нормальних клітин у дозах 1,0; 5,0; 10,0 Гр у поєднанні з фотодинамічним впливом (червоне світло та «Фотолон» в концентрації 0,05 мг/мл) викликає загибель 43, 67 та 88 % клітин, відповідно дозі (рис. 6).

The method of photodynamic therapy is one of the effective minimally invasive modern approaches in treatment of dysplastic disorders and malignancies, especially in the early stages of their development. Certain conditions are necessary for the successful performance of PDT, namely optimal concentration of photosensitizer, irradiation with optical light of a certain wavelength, which corresponds to the peak absorption of photosensitizer, and sufficient power density of radiation absorbed by the tumor.

It was established that X-ray irradiation of normal cells to 1.0, 5.0, and 10.0 Gy doses in combination with photodynamic exposure (red light and «Photolon» drug at 0.05 mg/ml concentration) caused the death of 43 %, 67 % and 88 % of cells, respectively (Fig. 6).

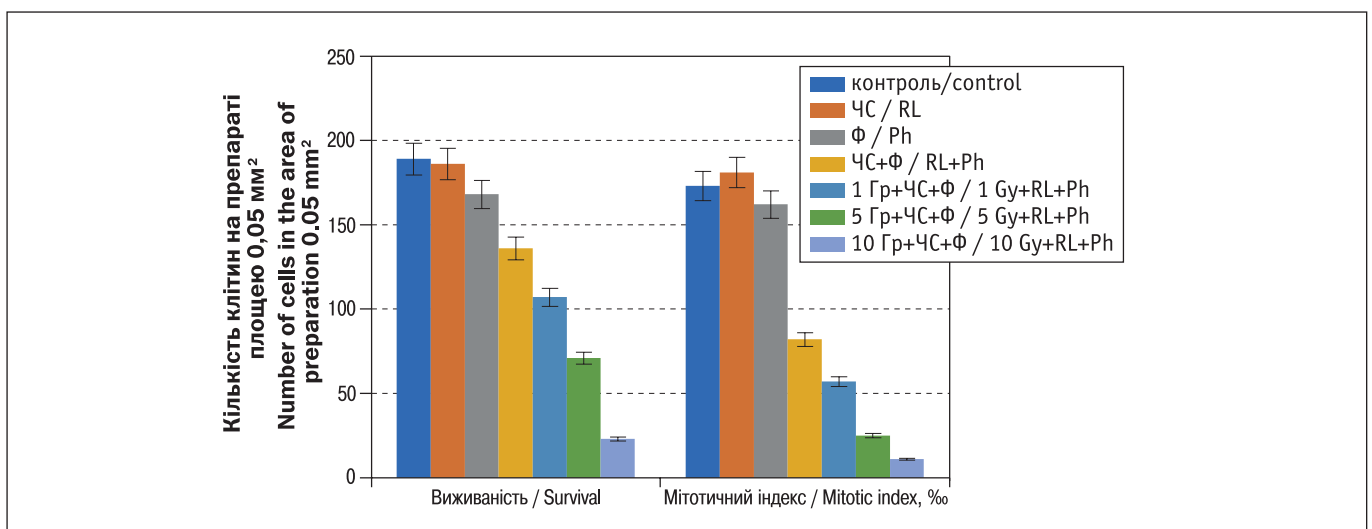


Рисунок 6. Морфофункціональні зміни у культурі нормальних фіброblastів людини, опромінені рентгенівськими променями у різних дозах та червоним світлом (ЧС) в присутності Фотолону (Ф) на 6-ту добу культивування

Figure 6. Morphofunctional changes in the culture of normal human fibroblasts on the 6th day of cultivation upon irradiation with X-rays in various doses and red light (RL) in the presence of Fotolon (F)

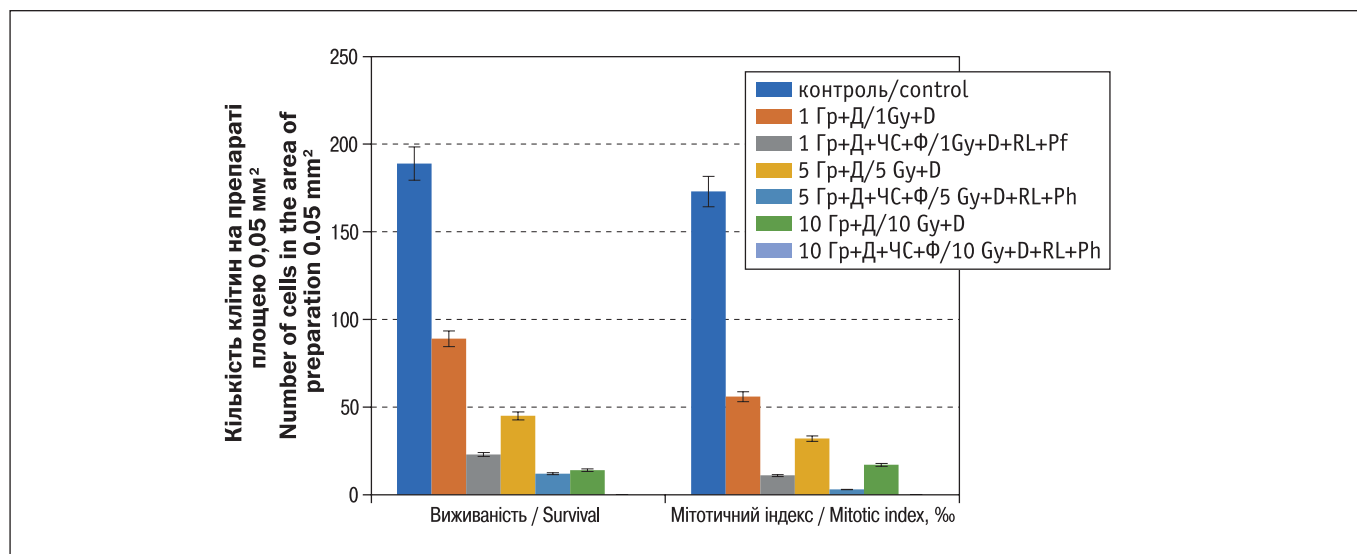


Рисунок 7. Морфофункціональні зміни у культурі нормальних фібробластів людини, опромінених рентгенівськими променями у різних дозах в присутності «Дотавіст», та червоним світлом з «Фотолоном» на 6-ту добу культивування

Figure 7. Morphofunctional changes in the culture of normal human fibroblasts on the 6th day of cultivation upon irradiation with X-rays at different doses in the presence of «Dotavist» drug and red light with «Fotolon» drug

Водночас, комбінований вплив двох бінарних променевих впливів (ФЗТ з «Дотавістом» та червоного світла з «Фотолоном») призводить до істотної загибелі фібробластів, а саме: опромінення в дозі 1,0 Гр з Дотавістом, червоним світлом з «Фотолоном» призвело до інактивації 87 % клітин; опромінення в дозі 5,0 Гр з «Дотавістом», червоним світлом з «Фотолоном» призвело до інактивації 94 % клітин, а після опромінення в дозі 10,0 Гр та вищезазначеного комплексу було інактивовано 100 % клітин (рис. 7).

Таким чином, виявилось, що культура нормальних фібробластів більш чутлива до впливу комплексу бінарних променевих дій, ніж культура злоякісних клітин лінії А-549.

За результатами експериментального дослідження було встановлено, що поєднана дія ФЗТ та ФДТ істотно підвищує загибель як злоякісних клітин, так і нормальних. Опромінення рентгенівськими променями в дозі 10,0 Гр в присутності «Дотавісту» у поєднанні з червоним світлом з фотосенсибілізатором «Фотолон» призводить до загибелі 100 % нормальних фібробластів та 99 % злоякісних клітин лінії А-549. За вказаних умов експерименту близько 1 % злоякісних клітин залишаються життєздатними, що може викликати їх репопуляцію та рецидивування пухлини.

At the same time, the combined effect of two binary radiation exposures (PCT with «Dotavist» and red light with «Fotolon») leads to significant death of fibroblasts, namely the irradiation to a dose of 1.0 Gy with «Dotavist» application, and red light with «Fotolon» has led to inactivation of 87 % of cells. Irradiation to a dose of 5.0 Gy with «Dotavist» application, and red light with «Fotolon» has led to inactivation of 94 % of cells. Finally, after irradiation to a dose of 10.0 Gy and with the above complex the 100 % of cells were inactivated (Fig. 7).

Thus, it turned out that the culture of normal fibroblasts is more sensitive to the influence of a complex of binary radiation impacts than the culture of malignant cells of the A-549 line.

According to the results of experimental study it was established that the combined effect of PCT and PDT significantly increases the death of both malignant and normal cells. Irradiation with X-rays to a dose of 10.0 Gy in the presence of «Dotavist» drug in combination with red light with «Photolon» photosensitizer has led to the death of 100 % of normal fibroblasts and 99 % of malignant cells of the A-549 line. Under the specified experimental conditions about 1 % of malignant cells remain viable, which can cause their repopulation and tumor recurrence.

ВИСНОВОК

Отримані результати складають підґрунтя доклінічного етапу оцінки ефективності поєднаного впливу двох бінарних технологій та препаратів, що застосовуються у фотон-захватній технології та фотодинамічній терапії, – фотон-захватного агента «Дотавіст» та фотосенсибілізатора «Фотолон», відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Променева терапія XXI століття / В. С. Іванкова, О. Ю. Столярова, Л. М. та ін. *Клінічна онкологія*. 2018. Т. 8, № 2(30). Режим доступу: <https://www.clinicaloncology.com.ua/article/magazine/35>
2. 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.
3. Kulakov V. N., Lipengol'ts A. A., Grigor'eva E. Y., Shimanovskii N. L. Pharmaceuticals for binary radiotherapy and their use for treatment of malignancies. *Pharm Chem J*. 2016; 50(6): 388–93. doi: 10.1007/s11094-016-1457-3.
4. The effect of Boron neutron capture therapy targeting tumor endothelial cells to clinically relevant radioresistant cells KURRI / Y. Kuwahara, M. Fukumoto, Y. Sakurai et al. *Progr. Rept.* 2010. VIII-II-1. Project Research. Project 8. URL: <https://www.rii.kyoto-u.ac.jp/PUB/report/PR/ProgRep2010/ProgRep2010.html>.
5. Pilot clinical study of boron neutron capture therapy for recurrent hepatic cancer involving the intra-arterial injection of a 10BSH-containing WOW emulsion / H. Yanagie, S. Higashi, K. Seguchi et al. *Appl Radiat Isot.* 2014. Vol. 88. P.32–37. doi:1016/j.apradiso.2014.01.014.
6. Boron neutron capture therapy of malignant gliomas / S. I. Miyatake, S. Kawabata, R. Hiramatsu et al. *Progress in Neurological Surgery*. 2018. Vol. 32. 48–56. doi: 10.1159/000469679.
7. Dymova M. A., Taskaev S. Y., Richter V. A., Kulgina E. V. Boron neutron capture therapy: Current status and future perspectives. *Cancer Commun (Lond)*. 2020. Vol. 40, N 9. P. 406–421. doi: 10.1002/cac2.12089
8. A new generation of ultrasmall nanoparticles inducing sensitization to irradiation and copper depletion to overcome radioresistant and invasive cancers / P. Rocchi, D. Bricart-Vernos, F. Lux et al. *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, № 4. p. 814. doi: 10.3390/pharmaceutics14040814.
9. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature / R. L. Yanovsky, D. W. Bartenstein, G. S. Rogers, et. al. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 2019. Vol. 35, № 5. P. 295–303. doi: 10.1111/phpp.12489.
10. Дунаевская В. В., Церковский Д. А., Татарчук Т.Ф., Гончарук И. В. Фотодинамическая терапия в клинической онкологии (аналитический обзор и собственный опыт). *Клінічна онкологія*. 2020. Т. 10, № 3–4. С. 120–127. doi: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.39-3.27393.

CONCLUSION

The obtained results provide basis of preclinical evaluation of effectiveness of the combined impact of two binary technologies and drugs used in photon capture technology and photodynamic therapy i.e. the photon capture agent «Dotavist» and «Fotolon» photosensitizer respectively.

REFERENCES

1. Ivankova VS, Stolyarova OYu, Baranovska LM, Khruleno TV, Skomorkhova TV, Pynov VA. [Radiotherapy of the XXI century] *Klinichna onkologiya*. 2018; 8(2). Access mode: <https://www.clinicaloncology.com.ua/article/magazine/35>. Ukrainian.
2. 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] *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2017. 16 (3): 192-209. doi: 10.20538/1682-0363-2017-3-192-209. Russian.
3. Kulakov V. N., Lipengol'ts A. A., Grigor'eva E. Y., Shimanovskii N. L. Pharmaceuticals for binary radiotherapy and their use for treatment of malignancies. *Pharm Chem J*. 2016; 50(6): 388-93. doi: 10.1007/s11094-016-1457-3.
4. The effect of Boron neutron capture therapy targeting tumor endothelial cells to clinically relevant radioresistant cells KURRI / Y. Kuwahara, M. Fukumoto, Y. Sakurai et al. *Progr. Rept.* 2010. VIII-II-1. Project Research. Project 8. URL: <https://www.rii.kyoto-u.ac.jp/PUB/report/PR/ProgRep2010/ProgRep2010.html>.
5. Yanagie H, Higashi S, Seguchi K, Ikushima I, Fujihara M, Nonaka Y, et al. Pilot clinical study of boron neutron capture therapy for recurrent hepatic cancer involving the intra-arterial injection of a 10BSH-containing WOW emulsion. *Appl Radiat Isot.* 2014;88:32??. doi:1016/j.apradiso.2014.01.014.
6. Miyatake SI, Kawabata S, Hiramatsu R, Kuroiwa T, Suzuki M, Ono K. Boron neutron capture therapy of malignant gliomas. *Progress in Neurological Surgery*. 2018;32:48-56. doi: 10.1159/000469679.
7. Dymova MA, Taskaev SY, Richter VA, Kulgina EV. Boron neutron capture therapy: Current status and future perspectives. *Cancer Commun (Lond)*. 2020;40(9):406-21. doi: 10.1002/cac2.12089
8. A new generation of ultrasmall nanoparticles inducing sensitization to irradiation and copper depletion to overcome radioresistant and invasive cancers / P. Rocchi, D. Bricart-Vernos, F. Lux et al. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):814. doi: 10.3390/pharmaceutics14040814.
9. Yanovsky RL, Bartenstein DW, Rogers GS, Isakoff SJ, Chen ST. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 2019;35(5): 295-303. doi: 10.1111/phpp.12489.
10. Dunaevskaya W, Tserkovsky DA, Tatarchuk TF, Goncharuk IV. [Photodynamic therapy in clinical oncology (analytical review and own experience)]. *Klinichna onkologiya*. 2020;10(3-4): 120-7. doi: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.39-3.27393. Russian.

11. Long-term in vivo clearance of gadolinium-based AGuIX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection / L. Sancey, S. Kotb, C. Truillet et al. *ACS Nano*. 2015. Vol. 9. P. 2477–2488. doi: 10.1021/acs.nano.5b00552.
12. AGuIX® from bench to bedside-Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine / F. Lux, Vu Long Tran, E. Thomas et al. *Br J Radiol*. 2019. Vol. 92(1093). P. 20180365. doi: 10.1259/bjr.20180365.
13. Bonvalot S, Le Pechoux C, De Baere T, Kantor G, Buy X, Stoeckle E, et al.. First-in-human study testing a new radioenhancer using nanoparticles (NBTXR3) activated by radiation therapy in patients with locally advanced soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*. 2017. Vol. 23. P. 908–17. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1297
14. Antitumor efficacy of extracellular complexes with gadolinium in Binary radiotherapy / A. A. Lipengolts, A. A. Cherepanov, V. N. Kulakov et al. *Appl Radiat Isot*. 2015. Vol.106. P. 233–236. doi: 10.1016/j.apradiso.2015.07.051.
15. 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.
16. A new generation of ultrasmall nanoparticles inducing sensitization to irradiation and copper depletion to overcome radioresistant and invasive cancers / P. Rocchi, D. Brichart-Vernos, F. Lux et al. *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, № 4. P. 814. doi: 10.3390/pharmaceutics14040814.
17. Thakare V, Tran VL, Natuzzi M, Thomas E, Moreau M, Romieu A, et al. Functionalization of theranostic AGuIX® nanoparticles for PET/MRI/optical imaging. *RSC Adv*. 2019. Vol. 9, № 43. P. 24811–24815. doi: 10.1039/c9ra00365g.
18. 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.
19. Photon activated therapy (PAT) using monochromatic synchrotron x-rays and iron oxide nanoparticles in a mouse tumor model: feasibility study of PAT for the treatment of superficial malignancy / Gi-Hwan Cho, Seung-Jun Seo, Ki-Hong Kim et al. *Radiat. Oncol*. 2012. Vol. 7. № 1. P. 184–190. doi: 10.1186/1748-717X-7-184.
20. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / под общ. ред. Л. П. Дьяконова. М. : «Спутник+», 2009. 656 с.
21. Морфофункциональные характеристики саркомы m-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.
11. Sancey L, Kotb S, Truillet C, Appaix F, Marais M, Thomas E. Long-term in vivo clearance of gadolinium-based AGuIX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection. *ACS Nano*. 2015;9:2477-88. doi: 10.1021/acs.nano.5b00552.
12. Francois L, Long Tran V, Thomas E, Dufort S, Rossetti F, Martini M. et al. AGuIX® from bench to bedside-Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine. *Br J Radiol*. 2019;92(1093):20180365. doi: 10.1259/bjr.20180365.
13. Bonvalot S, Le Pechoux C, De Baere T, Kantor G, Buy X, Stoeckle E, et al.. First-in-human study testing a new radioenhancer using nanoparticles (NBTXR3) activated by radiation therapy in patients with locally advanced soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*. 2017; 23:908-17. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1297
14. Lipengolts A. A., Cherepanov A. A., Kulakov V. N., Grigorieva E. Y., Sheino I. N., Klimanov V. A. Antitumor efficacy of extracellular complexes with gadolinium in Binary radiotherapy. *Appl Radiat Isot*. 2015;106:233-6. doi: 10.1016/j.apradiso.2015.07.051.
15. Aleksandrova EN, Tserkovsky DA, Istomin YuP. [Antitumor efficacy of photodynamic therapy with a photosensitizer photolon in combination with cisplatin in an in vitro experiment]. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal: materials of the conference «Domestic anti-neoplastic drugs»*. 2016;15(1):5-6. Russian
16. Rocchi P, Brichart-Vernos D, Lux F, Morfin I, David L, Rodriguez-Lafrasse C, Tillement O. A new generation of ultrasmall nanoparticles inducing sensitization to irradiation and copper depletion to overcome radioresistant and invasive cancers / *Pharmaceutics*. 2022;14(4):814. doi: 10.3390/pharmaceutics14040814.
17. Thakare V, Tran VL, Natuzzi M, Thomas E, Moreau M, Romieu A, et al. Functionalization of theranostic AGuIX® nanoparticles for PET/MRI/optical imaging. *RSC Adv*. 2019 Aug 9;9(43):24811-24815. doi: 10.1039/c9ra00365g.
18. Kubasova IYu, Smirnova ZS, Borisova LN, Kiseleva MP, Vainson AA, Meshcherikova W et al. [The efficiency of the combined use of radiation and photodynamic therapy in the treatment of epidermoid carcinoma of the lung Lewis mice]. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal*. 2007;6(1):92-105. Russian
19. Choi Gi-Hwan , Seo Seung-Jun, Kim Ki-Hong, Park Sung-Hwan, Lim Jae-Hong, Kim Jong-Ki et al. Photon activated therapy (PAT) using monochromatic synchrotron x-rays and iron oxide nanoparticles in a mouse tumor model: feasibility study of PAT for the treatment of superficial. *Radiat. Oncol*. 2012;7(1):184-190.
20. [Animal cell in culture (Methods and application in biotechnology)] / ed. LP Dyakonov. М.: «Спутник +», 2009. 656 p. Russian
21. Yuzhakov W, 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
22. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN [Statistical methods in biomedical research using Excel]. 2nd ed. K.: MORION, 2001.408 p. Russian

22. 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.
23. Почапінський О. Д., Лавренчук Г. Й., Атаманюк Н. П., Чернишов А. В. Відбір та апробування експериментальних моделей нормальних та злоякісних клітин людини *in vitro* та дослідження меж їх чутливості для нейтронозахватних, фотон-захватних агентів та фотосенсибілізаторів. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2021. Вип. 26. С. 204–216. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-204-216.
23. Pochapinskyi OD, Lavrenchuk GYo, Atamaniuk NP, Chernyshov AV. 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. *Problems of Radiation Medicine and Radiobiology*. 2021;26;204-16. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-204-216.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Талько Вікторія Василівна – доктор медичних наук, професор, директор, завідувачка відділу радіобіології Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ, Україна, ORCID ID: 0000-0003-2073-8427

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

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

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, Україна

Чернишов Андрій Вікторович – кандидат медичних наук, науковий співробітник лабораторії клітинної радіобіології Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ, Україна

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Victoria V. Talko – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of Institute, Institute of Experimental Radiology, Head of Department, Department of Radiobiology, SI «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine, ORCID ID: 0000-0003-2073-8427

Halyna Y. 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, Ukraine, ORCID ID: 0000-0001-7200-712X

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, Ukraine

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, Ukraine

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, Ukraine

Стаття надійшла до редакції 5.09.2022

Received: 5.09.2022