

УДК: 616-006.6:615.849:001.89

Г. Й. Лавренчук✉, В. В. Талько, 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 КЛІТИНИ ЛЮДИНИ, ЩО ЗНАХОДЯТЬСЯ У СТАНІ СПОКОЮ

Мета: дослідити структурні та морфофункціональні зміни в тест-системі клітин недрібноклітинного раку легень людини (лінія А-549), що знаходяться у стані спокою, 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 злоякісних клітин людини, методи опромінення рентгенівськими променями, червоним світлом, цитологічні, статистичні.

Результати. Опромінення рентгенівськими променями в дозі 10,0 Гр за присутності фотон-захватного агента «Дотавіст» (у концентрації 100 мкг/мл поживного середовища) призводить до загибелі 75–83 % злоякісних клітин, що знаходяться у стані спокою, на 6–8-му добу культивування. Фотодинамічний вплив (світло червоного діапазону, 630 нм) у присутності фотосенсибілізатора «Фотолон» (у концентрації 200 мкг/мл), спричиняє, загибель 69–73 % злоякісних клітин, відповідно. Поєднання фотон-захватної технології та фотодинамічного впливу призводить до загибелі 90 % злоякісних клітин у фазі стаціонарного росту на 8-му добу культивування.

Висновок. Поєднання фотон-захватної технології (опромінення рентгенівськими променями з гадолінійвмісним фотон-захватним агентом «Дотавіст» у цитотоксичній концентрації) та фотодинамічного впливу у присутності фотосенсибілізатора «Фотолон» підвищує ефективність девіталізації клітин недрібноклітинного раку легень людини (лінія А-549), що знаходяться у стаціонарній фазі росту, до 90 %. 10 % клітин, резистентних до впливу застосованих технологій, зберігають свій проліферативний потенціал, що при подальшому культивуванні проявляється змінами морфології, генотипу та адгезивності.

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

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2023. Вип. 28. С. 206–215. doi: 10.33145/2304-8336-2023-28-206-215

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

G. Y. Lavrenchuk✉, V. V. Talko, A. V. Chernyshov

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

EFFECTIVENESS OF THE PHOTON CAPTURE BEAM TECHNOLOGY AND PHOTODYNAMIC IMPACT ON MALIGNANT HUMAN CELLS IN A RESTING STATE

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

Methods. Passaged malignant human cell culture technology, X-ray and red light exposure, cytological and statistical methods.

Results. X-ray exposure at a dose of 10.0 Gy in the presence of photon capture agent «Dotavist» (at a 100 µg/ml nutrient medium concentration) led to death of 75–83 % of malignant cells in a resting state on the 6–8th day of cultivation. Photodynamic exposure (630 nm wavelength red light) in the presence of «Photolon» photosensitizer (200 µg/ml concentration) resulted in death of 69–73 % of malignant cells, respectively. Combination of the photon-capturing technology and photodynamic exposure resulted in death of 90 % of the malignant cells in a phase of steady-state growth on the 8th day of cultivation.

Conclusion. Combination of the photon capture technology (X-ray exposure with gadolinium-containing photon capture agent «Dotavist» in cytotoxic concentration) and photodynamic exposure in the presence of «Photolon» photosensitizer increased devitalization effectiveness of human non-small cell lung cancer cells (A-549 cell line) being in a steady-state growth phase up to 90 %. Ten percent of cells resistant to the applied technologies retained their proliferative potential, evident as changes in their morphology, genotype and adhesiveness during further cultivation.

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

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2023;28:206-215. doi: 10.33145/2304-8336-2023-28-206-215

ВСТУП

Рак залишається основною проблемою охорони здоров'я та другою причиною смертності в усьому світі. За оцінками, у 2020 р. у всьому світі було зареєстровано близько 20 млн нових випадків раку та 10 млн смертей від них [1]. За прогнозами Всесвітньої організації охорони здоров'я до 2030 року кількість нових випадків може сягнути 15 млн на рік, а випадків смерті — 10 млн, що призведе до виходу смертності від раку на перше місце [2]. Серед усіх захворювань на рак друге місце за поширеністю (11,4 %), та перше місце за смертністю (18 %) посідає рак легень [2]. Очікується, що до 2035 року в більшості країн світу рівень захворюваності на рак легень продовжуватиме зростати [3].

Для боротьби з такими небезпечними для життя захворюваннями терміново потрібні безпечні та ефективні стратегії. Однак традиційні терапевтичні методи, такі як променева терапія, хіміотерапія та хірургія, виявляють неоптимальну ефективність при

INTRODUCTION

Cancer remains a major public health problem and the second leading cause of death worldwide. According to estimates, about 20 million new cases of cancer and 10 million deaths among them were registered worldwide in 2020 [1]. According to forecasts of the World Health Organization the number of new cases by 2030 may reach 15 million per year, and number of deaths may exceed 10 million bringing the cancer mortality to the first place among other causes of death [2]. Lung cancer ranks second in prevalence (11.4 %) and first in mortality (18 %) among all malignancies [2]. It is expected that by 2035 the incidence rate of lung cancer will continue to increase in most countries of the world [3].

Safe and effective strategies are urgently needed to control such life-threatening diseases. However, traditional therapeutic methods such as radiation therapy, chemotherapy, and surgery show subopti-

✉ Galyna Yo. Lavrencguk, e-mail hl20071956@ukr.net

злюкисних пухлинах через серйозні побічні ефекти, стійкість до ліків і навіть рецидиви.

Одним з основних методів лікування, який на сьогодні у найбільш економічно розвинених країнах потребують від 50 до 80 % всіх онкологічних хворих, є променева терапія. Дистанційні джерела γ -випромінювання та прискорювачі електронів, що використовуються у клінічній практиці, досягли практично межі свого технічного розвитку і дозволяють націлювати іонізуюче випромінювання на пухлину з дуже високим ступенем вибірконості та конформності. Водночас серйозним обмеженням застосування радикальної дистанційної променевої терапії у клінічній практиці є надмірно високе променеве навантаження на нормальні тканини організму при спробах збільшення терапевтичної ефективності за рахунок ескалації дози опромінення пухлини.

Одним із шляхів підвищення ефективності променевої терапії є розробка та впровадження в клінічну практику бінарної променевої терапії, зокрема, фотон-захватної технології (ФЗТ) лікування злюкисних новоутворень за допомогою іонізуючого випромінювання, в якій для забезпечення протипухлинного ефекту використовуються два компоненти – препарат, що вводиться в організм, і зовнішнє джерело випромінювання [4]. На відміну від променевої терапії з використанням препаратів–радіомодифікаторів, здатних змінювати радіочутливість пухлинних тканин, у фотон-захватній технології (ФЗТ) 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 іонізуючим випромінюванням зі значно більшою ймовірністю, ніж елементи, що входять до складу нормальних тканин [4]. До переваг ФЗТ, у порівнянні з традиційними методами променевої терапії, належить те, що підведення необхідної терапевтичної дози до біологічної мішені (пухлини) здійснюється створенням певної концентрації препарату, а не націлюванням і фокусуванням пучка випромінювань. Найбільшу ефективність у якості фотон-захватного агентів виявляють препарати на основі гадотерової кислоти, що не має специфічної фармакодинамічної активності та є біологічно високоінертною [5, 6]. Метод ФЗТ, що використовує більш доступні фотонні джерела, зокрема, рентгенівське випромінювання, є найбільш перспективним і придатним для широкого використання в клінічній онкологічній практиці.

Фотодинамічна терапія (ФДТ) є мінімально інвазивним терапевтичним методом, який привернув ве-

mal efficacy in cancer patients due to serious side effects, drug resistance, and even relapses.

Radiation therapy is one of the main methods of treatment, which today in the most economically developed countries is required in management of 50 to 80 % of all cancer patients. The γ -radiation sources of external beam radiotherapy and electron accelerators used in clinical practice have almost reached the limit of their technical development and allow targeting of ionizing radiation to the tumor with a very high degree of selectivity and conformity. At the same time an excessively high radiation load on normal tissues of the body is a serious limitation of the use of radical remote radiation therapy in clinical practice when trying to increase the therapeutic efficiency due to escalation of radiation dose to the tumor.

One of the ways to increase the effectiveness of radiation therapy is the development and introduction into clinical practice of binary radiation therapy, in particular the photon capture technology (PCT) for treatment of malignant neoplasms with the help of ionizing radiation, in which two components are used to ensure the antitumor effect, namely drug injected into the body and external source of radiation [4]. In contrast to radiation therapy with the use of radiomodifying drugs capable of changing the radiosensitivity of tumor tissues, in PCT the drugs with no pronounced biological activity in certified doses are used. Such drugs must contain one or more chemical elements capable of interacting with external ionizing radiation with much higher probability than elements in normal tissue [4]. Advantages of PCT in comparison with traditional methods of radiation therapy include the fact that required therapeutic dose is delivered to biological target (tumor) by creating a certain concentration of the drug, and not by targeting and focusing the radiation beam. The most effective photon-capturing agents are drugs based on gadoteric acid having no specific pharmacodynamic activity and being highly inert biologically [5, 6]. The PCT method in which the more accessible photon sources i.e. X-rays are used, is the most promising and suitable one for wide use in clinical oncology practice.

Photodynamic therapy (PDT) is a minimally invasive therapeutic method that has drawn much attention in recent years as a new approach in

лику увагу в останні роки як нова терапія для лікування раку. ФДТ використовує фотосенсибілізатори, які після збудження світлом із певною довжиною хвилі реагують з молекулярним киснем, утворюючи активні форми кисню в цільовій тканині, що призводить до загибелі клітин [7, 8]. Порівняно зі звичайними терапевтичними методами, ФДТ демонструє більшу селективність проти пухлинних клітин завдяки використанню фотосенсибілізаторів, які переважно локалізуються в пухлинних ураженнях, і точному світловому опроміненню цих уражень. ФДТ продовжує інтенсивно розвиватися як багатообіцяюча стратегія лікування різних новоутворень у поєднання з променевою терапією, хімотерапією, імунотерапією та хірургією [9, 10].

Резистентність злоякісних пухлин як до протипухлинних препаратів, так і до впливу радіаційного та інших фізичних факторів становить одну з актуальних проблем клінічної та експериментальної онкології. Резистентність формується у вигляді сукупності специфічних і неспецифічних, зворотних і незворотних метаболічних, структурних, функціональних, генетичних та інших змін, що виникли у певні терміни після впливу на пухлинні клітини, і розглядається як пристосувальна реакція. Особливе місце у цій проблемі займає не тільки існуюча резистентність пухлинних клітин, а й здатність їх набувати стійкість до протипухлинних агентів у процесі лікування [11].

В експерименті *in vitro* було досліджено вплив двох бінарних технологій (ФЗТ та ФДТ) окремо та у поєднанні на клітини недрібноклітинного раку легень людини (лінія А-549) у перешеплюваній моношаровій культурі за морфофункціональними характеристиками (кінетика росту, проліферативна та мітотична активність). Результати дослідження засвідчили, що злоякісні клітини А-549 є досить стійкими до різних варіантів бінарних променевих впливів. Максимальна ефективність застосованих технологій визначена за їх поєднаної дії, при тому 1 % клітин залишаються живими. Це можуть бути клітини, що знаходяться у спокої (у фазі стаціонарного росту), а також поліплоїдні клітини, що виникають в пухлині у великій кількості за несприятливих умов росту, і здатні ініціювати рецидивування первинної пухлини.

МЕТА

Дослідити структурні та морфофункціональні зміни в тест-системі клітин недрібноклітинного раку легень людини (лінія А-549), що знаходяться у стані спокою, опромінені рентгенівськими променями в присутності гадолінійвмісного фотон-захватного

cancer management. PDT includes the use of photosensitizers that after being excited by light of a certain wavelength react with molecular oxygen, forming reactive oxygen species in the target tissue, which leads to cell death [7, 8]. Compared to conventional therapeutic methods, PDT shows greater selectivity against tumor cells due to the use of photosensitizers that are preferentially accumulated in tumor tissue followed by precise light irradiation of tumor. PDT continues to be intensively developed as a promising strategy for the treatment of various neoplasms in combination with radiation therapy, chemotherapy, immunotherapy, and surgery [9, 10].

Resistance of malignant tumors both to anti-cancer drugs and ionizing radiation or other physical factors is one of the urgent challenges in clinical and experimental oncology. Resistance is formed as a set of specific and non-specific reversible and irreversible metabolic, structural, functional, genetic and other changes occurring at certain time points upon impact on tumor cells, and is considered an adaptive reaction. Not only the existing resistance of tumor cells, but also their ability to acquire resistance to antitumor agents during treatment is an especial issue within this problem [11].

The effect of two binary technologies (PCT and PDT) separately and in combination on human non-small cell lung cancer cells (A-549 cell line) in a passaged monolayer culture was investigated according to morphofunctional characteristics (growth kinetics, proliferative and mitotic activity) in an *in vitro* experiment. Results of experiment proved that malignant A-549 cells are quite resistant to various options of binary radiation effects. Maximum effectiveness of the applied technologies was under their combined action, while 1 % of cells remained alive. These can be cells that are at rest (in the phase of steady-state growth), as well as polyploid cells that arise in tumor in large numbers under unfavorable growth conditions and are able to initiate relapse of the primary tumor.

OBJECTIVE

To study the structural and morphofunctional changes in the test system of human non-small cell lung cancer cells (A-549 cell line) in a resting state irradiated with X-rays in the presence of gadolinium-containing photon-capturing agent

агента «Дотавіст», та світла оптичного діапазону (червоне світло) у поєднанні з фотосенсибілізатором «Фотолон».

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження виконані на перешеплюваній моношаровій культурі клітин недрібноклітинного раку легень людини лінії A-549, що походять з карциноми легень людини епітеліоподібної морфології, наданих Банком клітинних культур Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології НАН України.

Клітини культивували у 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 [13]. Клітини вирощували при постійній температурі 37 °C та 5 % CO₂ на покривних скельцях розмірами (16×8) мм, які знаходилися на дні скляних пляшечок,

На 6-ту добу до клітин додавали «Дотавіст» (у концентрації 100 мкл/мл поживного середовища) та «Фотолон» (у концентрації 200 мкг/мл). За 1 год культуру клітин опромінювали рентгенівськими променями на апараті РУМ-17 при напрузі на трубіці 180 кВ, силі струму 15 мА, фільтрах 2,5 мм Cu + 1 мм Al, потужності дози 1,47 Гр/хв, в дозі 10,0 Гр і фокусній відстані 40 мм та/або світлом червоного діапазону на апараті «Барва-LED/630» (одичний світлодіод і площа світлового потоку відповідає площі дна пляшечки, на якому ростуть клітини) у дозі 45 Дж/см² (25 мВт/см² за 30 хв).

Тест-системою клітин у стані спокою (стаціонарній фазі росту) вважали культури клітин на 6-ту добу культивування, конфлуент яких досягає 80–90 %.

Структурні та морфофункціональні зміни у культурі клітин вивчали на 6, 7, 8-му добу культивування за показниками життєздатності (виживаності). Готували препарати: фіксували 96° етанолом та фарбували гематоксилін-еозином, на предметне скло 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 розраховували 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 гіпо-

«Dotavist» and light of the optical range (red spectrum) in combination with «Photolon» photosensitizer.

MATERIAL AND METHODS

Studies were performed on a passaged monolayer culture of the human non-small cell lung cancer cells (A-549 cell line), derived from human lung carcinoma of epithelioid morphology, provided by the Cell Culture Bank of the Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Cells were cultured in Advanced DMEM F/12 complete nutrient medium (GIBCO) containing 2 % fetal calf serum (GIBCO), Pen Strep Glutamine (GIBCO), according to the standard cell strain methods [13]. Cells were grown at a constant temperature of 37 °C and 5 % CO₂ on coverslips 16×8 mm, located at the bottom of glass bottles.

On the 6th day «Dotavist» (100 μl/ml nutrient medium concentration) and «Photolon» (200 μg/ml concentration) were added to the cells. In 1 hour the cell culture was irradiated with X-rays on the RUM-17 device at 180 kV tube voltage, 15 mA current, 2.5 mm Cu + 1 mm Al filters, 1.47 Gy/min dose rate, in 10.0 Gy dose, and 40 mm focal distance and/or with light of the red range on the Barva-LED/630 device (a single LED and the area of the light flux corresponded to the area of the bottle bottom on which the cells grew) at 45 J/cm² dose (25 mW/cm² for 30 min).

The cell cultures on the 6th day of cultivation, the confluence of which reaches 80–90 %, were considered the test system of cells in a resting state (steady-state growth phase).

Structural and morphofunctional changes in cell culture were studied on the 6th, 7th, and 8th days of cultivation according to indicators of viability (survival). Preparations were treated in such a way as fixed with 96° ethanol, stained with hematoxylin-eosin, and pasted on a glass slides with Canadian balsam. The total number of cells and number of mitoses were counted under the optical microscope «Axioscop» (West Germany) at ×1000 magnification within a grid using the method of random fields according to S. B. Stefanov. Mitotic index was calculated per 1000 cells (%).

Statistical analysis of probability of the obtained data was carried out using the Student's *t*-test performed in the Microsoft Excel and Biostat computer software with preliminary testing of hypothesis

тези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова – Смірнова [14].

При виконанні дослідження було проаналізовано 1012 препаратів культур клітин.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У попередніх експериментальних дослідженнях *in vitro* визначено ефективність поєднаної дії двох бінарних технологій (ФЗТ і ФДТ) щодо виживаності проліферуючих злякисних клітин лінії А-549. 1 % клітин (клітини у стані спокою, поліплоїдні) залишалися живими, складаючи, ймовірно, резерв для рецидивування чи метастазування пухлини.

Враховуючи високу резистентність злякисних клітин у стані спокою до впливу бінарних технологій, було обрано опромінення рентгенівськими променями у дозі 10,0 Гр, що призводило загибелі 80 % проліферуючих злякисних клітин [15]. Вибір препарату «Дотавіст» в якості фотон-захватного агента зумовлений наявністю гадолінію у складі цього препарату, що важливо для фотон-захватної терапії. Дослідження меж чутливості злякисних клітин людини щодо фотон-захватних агентів *in vitro* дозволили визначити оптимальну концентрацію препарату «Дотавіст» з максимальним цитотоксичним ефектом (100 мкг/мл), що відповідає 29,7 мг гадотерівої кислоти на 1 мл поживного середовища. Фотосенсибілізатор «Фотолон» (на основі хлорину е6), засіб для ФТД третього покоління, визнаний найкращим у світі із п'яти дозволених до клінічного застосування засобів для фотодинамічної діагностики та терапії злякисних новоутворень [16]. Для ФТД клітин у стані спокою застосовано «Фотолон» у концентрації 200 мкг/мл поживного середовища, при тому, що його цитотоксичні властивості щодо проліферуючих злякисних клітин проявлялися вже за концентрації понад 5–10 мкг/мл [15].

Тест-системою клітин у стані спокою (стаціонарній фазі росту) вважали культури клітин А-549 на 6-ту добу культивування, конфлуентність яких досягла 80–90 %. В таких культурах майже немає мітозів ($\leq 1\%$), клітини утворюють щільний моношар.

Структурні та морфофункціональні зміни у культурі клітин вивчали на 6, 7, 8-му добу культивування за показниками життєздатності (виживаності).

В умовах впливу рентгенівських променів в дозі 10 Гр одночасно з фотонзахватним агентом «Дотавіст» в концентрації 100 мкл/мл (29,7 мг гадотерівої кислоти) щільність клітинної популяції зменшилась до 25 % живих клітин на 6-ту добу та до 17 % живих клітин на 8-у добу культивування (рис. 1).

about normal distribution of random variables according to the Kolmogorov-Smirnov test [14].

During the research 1012 preparations of cell culture were analyzed.

RESULTS AND DISCUSSION

In the previous *in vitro* experimental studies the effectiveness of combined action of two binary technologies (PCT and PDT) on survival of proliferating malignant cells of the A-549 cell line was determined. One percent of cells (resting cells, polyploid) remained alive, probably forming a reserve for the tumor recurrence or metastasing.

Taking into account high resistance of malignant cells at a resting state to the influence of binary technologies, X-ray irradiation at 10.0 Gy dose was chosen resulting in the death of 80 % of proliferating malignant cells [15]. Choice of the drug «Dotavist» as a photon-capturing agent was due to the presence of gadolinium in its composition being important for photon-capturing therapy. Studies of the limits of sensitivity of malignant human cells to photon-capturing agents *in vitro* made it possible to determine the optimal concentration of «Dotavist» drug with maximum cytotoxic effect (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) corresponding to 29.7 mg of gadoteric acid per 1 ml of nutrient medium. Photosensitizer «Fotolon» (based on chlorine e6), a third-generation PDT agent, is recognized as the best one in the world among five molecules approved for clinical use for photodynamic diagnosis and therapy of cancer [16]. «Photolon» was used in PDT of resting cells at a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of nutrient medium, despite the fact that its cytotoxic properties against proliferating malignant cells were already evident at concentrations above 5–10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [15].

A-549 cell line cultures on the 6th day of cultivation, the confluency of which reached 80–90 %, were considered the test system of cells in a resting state (steady-state growth phase). There are almost no mitoses ($\leq 1\%$), and cells form a dense monolayer in such culture.

Structural and morphofunctional changes in cell culture were studied on the 6th, 7th, and 8th days of cultivation according to indicators of viability (survival).

Under conditions of exposure to X-rays at 10 Gy dose simultaneously with photon-capturing agent «Dotavist» at 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ concentration (29.7 mg gadoteric acid) the density of cell population decreased to 25 % of living cells on the 6th day and to 17 % of living cells on the 8th day of cultivation (Fig. 1).

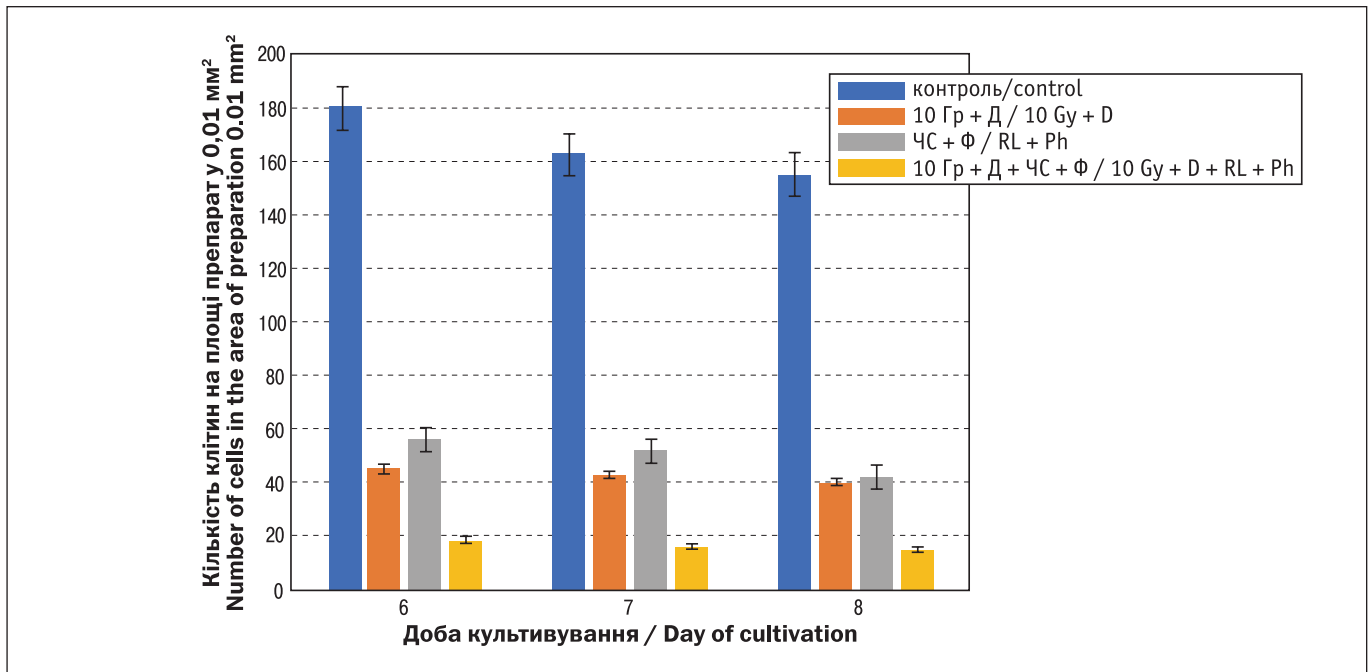


Рисунок 1. Вживаність злоякісних клітин A-549, що знаходяться у стані спокою, за умов окремого та поєданого впливу рентгенівського опромінення у дозі 10,0 Гр з фотонзахватним агентом «Дотавіст» (Д) та червоного світла (ЧС) з фотосенсибілізатором «Фотолон» (Ф) на 6–8-у добу культивування.

Figure 1. Survival of malignant A-549 cells in a resting state under separate and combined X-ray exposure at a dose of 10 Gy with «Dotavist» photocapture agent (D) and red light (RL) with «Photolon» photosensitizer (Ph) on the 6–8th day of cultivation

Опромінення злоякісних клітин червоним світлом оптичного діапазону (630 нм) у поєднанні з фотосенсибілізатором «Фотолон» призводить теж до суттєвої їх загибелі, і в живих залишається 31 % клітин на 6-ту добу і 27 % на 8-у добу культивування.

Поєднання фотон-захватного (з «Дотавіст») та фотодинамічного (з «Фотолон») впливів призводять до загибелі 90 % злоякісних клітин у стані спокою. Таким чином, виживають 10 % клітин, які при подальшому культивуванні змінюють свою морфологію, генотип і адгезивність.

Поєднання фотон-захватної технології (опромінення рентгенівськими променями з гадоліній-вмісним фотон-захватним агентом «Дотавіст» у цитотоксичній концентрації) та фотодинамічного впливу у присутності фотосенсибілізатора «Фотолон» підвищує ефективність девіталізації клітин недрібноклітинного раку легень людини (лінія A-549), що знаходяться у стаціонарній фазі росту, до 90 %. 10 % клітин, резистентних до впливу застосованих технологій, зберігають свій проліферативний потенціал, що при подальшому культивуванні проявляється змінами морфології, генотипу та адгезивності.

Таким чином, визначені морфофункціональні зміни у культурах злоякісних клітин людини (A-549),

Irradiation of malignant cells with red light of the optical range (630 nm) in combination with «Fotolon» photosensitizer also led to their significant death, when 31 % of cells remained alive on the 6th day and 27% on the 8th day of cultivation.

Combination of the photon-capturing (by «Dotavist») and photodynamic (by «Fotolon») effects has led to death of 90 % of malignant cells in a resting state. Thus, 10 % of cells survive, which change their morphology, genotype, and adhesiveness during further cultivation.

Combination of the photon-capturing technology (irradiation with X-rays with administration of gadolinium-containing photon capture agent «Dotavist» in cytotoxic concentration) and photodynamic exposure in the presence of «Photolon» photosensitizer increased the effectiveness of devitalization of human non-small cell lung cancer cells (A-549 cell line) being in a steady-state growth phase up to 90 %. Ten percent of cells resistant to the influence of the applied technologies retain their proliferative potential, manifested by changes in morphology, genotype, and adhesiveness during further cultivation.

Thus, morphofunctional changes in cultures of human malignant cells (A-549 cell line) being in a

що знаходяться у стаціонарній фазі росту, тобто в гіпоксичних умовах та щільному конфлуентному стані й збідненому ростовому середовищі за умов окремого та поєднаного впливу рентгенівських променів (з гадолінійвмісним агентом) та червоного світла (з фотосенсибілізатором) та при поєднанні цих бінарних технологій. Встановлено, що в умовах гіпоксії, клітини у стані спокою зберігають свій проліферативний потенціал, є генетично нестабільними (полікаріоцити та гігантські одноподібні клітини). Цитологічні особливості полягали у виникненні та наростанні гетерогенності клітинних популяцій; поліморфізмі ядер; утворенні багатоядерних клітин (частіше з непарним числом ядер), симпластичних структур; збільшенні кількості двоядерних клітин, в тому числі, в нерівноцінному об'ємі та з неправильною формою ядер); порушенні цитотомії та анізокаріозі; збільшенні кількості патологічних мітозів, особливо аберантних анафаз (відставання хромосом, хромосомні мости тощо.).

ВИСНОВОК

Поєднання фотон-захватної технології (опромінення рентгенівськими променями з гадолінійвмісним фотон-захватним агентом «Дотавіст» у цитотоксичній концентрації) та фотодинамічного впливу у присутності фотосенсибілізатора «Фотолон» підвищує ефективність девіталізації клітин недрібноклітинного раку легень людини (лінія А-549), що знаходяться у стаціонарній фазі росту, до 90 %. 10 % клітин, резистентних до впливу застосованих технологій, зберігають свій проліферативний потенціал, що при подальшому культивуванні проявляється змінами морфології, генотипу та адгезивності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Global, regional, and national lifetime probabilities of developing cancer in 2020 / R. Zheng, S. Wang, S. Zhang et al. *Sci. Bull (Beijing)*. 2023. 29:S2095-9273(23)00676-X.
2. Projections of lung cancer incidence by 2035 in 40 countries worldwide: population-based study / Luo G., Zhang, J. Etxeberria J. et al. *JMIR Public Health Surveill.* 2023. Vol.9:e43651. doi: 10.2196/43651
3. World Health Organization. Cancer. 2022, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
4. 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.
5. Long-term in vivo clearance of gadolinium-based AGuX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection / L. Sancey,

steady-state growth phase, i.e. in hypoxic conditions and dense confluent state in depleted growth medium under separate and combined exposure to X-rays (with a gadolinium-containing agent) and red light (with photosensitizer) and when combining these binary technologies have been identified. It was established that under hypoxia the resting cells retain their proliferative potential and are genetically unstable (polykaryocytes and giant mononuclear cells are present). Cytological features consisted in the emergence and growth of heterogeneity of cell populations, nuclear polymorphisms, formation of multinucleated cells (more often with an odd number of nuclei), symplastic structures, increase in the number of binucleated cells, including those in unequal volume and with irregularly shaped nuclei, abnormal cytotomy and anisokaryosis, increase in the number of abnormal mitoses, especially of aberrant anaphases (i.e. chromosome lagging, chromosomal bridges, etc.).

CONCLUSION

Combination of the photon-capturing technology (irradiation with X-rays with gadolinium-containing photon-capturing agent «Dotavist» in cytotoxic concentration) and photodynamic exposure in the presence of «Photolon» photosensitizer increases the effectiveness of devitalization of human non-small cell lung cancer cells (A-549 cell line) in a steady-state growth phase up to 90 %. Ten percent of cells resistant to the influence of the applied technologies retain their proliferative potential, manifested as changes in morphology, genotype and adhesiveness during further cultivation.

REFERENCES

1. Zheng R, Wang S, Zhang S, Chen R, Sun K et al. Global, regional, and national lifetime probabilities of developing cancer in 2020. *Sci. Bull (Beijing)*. 2023;29:S2095-9273(23)00676-X. doi: 10.1016/j.scib.2023.09.041.
2. Luo G, Zhang Y, Etxeberria J, Arnold M, Cai X, Hao Y, Zou H. Projections of lung cancer incidence by 2035 in 40 countries worldwide: population-based study. *JMIR Public Health Surveill.* 2023;9:e43651. doi: 10.2196/43651.
3. World Health Organization. Cancer. 2022, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
4. 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.

- S. Kotb, C. Truillet et al. *ACS Nano*. 2015. Vol. 9. P. 2477-2488. doi: 10.1021/acsnano.5b00552.
6. 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.
7. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions / J. H. Correia, J. A. Rodrigues, S. Pimenta et al. *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 3. 1332. doi: 10.3390/pharmaceutics13091332
8. Kim T. E., Chang J. E. Recent studies in photodynamic therapy for cancer treatment: from basic research to clinical trials (Review). *Pharmaceutics*. 2023. Vol.15, Iss. 9. P. 2257. doi: 10.3390/pharmaceutics15092257.
9. Karges J. Clinical development of metal complexes as photosensitizers for photodynamic therapy of cancer. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2022;61:e202112236. doi: 10.1002/anie.202112236.
10. Crous A., Abrahamse H. Photodynamic therapy of lung cancer, where are we? *Front Pharmacol*. 2022. Vol. 30, iss.13:932098. doi: 10.3389/fphar.2022.932098.
11. Зінченко В. А., Чащина Л. І. Можливі механізми стійкості пухлинних клітин до променевої і хіміотерапії. *Біополімери і клітина*. 2005. Т. 21. № 6. С. 473-484. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00070D>.
12. Ефективність фотон-захватної променевої технології та фотодинамічного впливу на злоякісні та нормальні клітини людини in vitro / В. В. Талько, Г. Й. Лавренчук, О. Д. Почапінський та ін. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2022. Вип. 27. С. 235-249. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27_234_248
13. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / под общ. ред. Л. П. Дьяконова. М. : «Спутник+», 2009. 656 с.
14. 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.
15. Відбір та апробування експериментальних моделей нормальних та злоякісних клітин людини in vitro та дослідження меж їх чутливості для нейтронозахватних, фотон_захватних агентів та фотосенсибілізаторів / О. Д. Почапінський, Г. Й. Лавренчук, Н. П. Атаманюк, А. В. Чернишов. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2021. Вип. 26. С. 204-216. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-204-216.
16. Chlorin e6: a promising photosensitizer in photo-based cancer nanomedicine / A. Hak, M. S. Ali, S. A. Sankaranarayanan et al. *ACS Appl. Bio. Mater*. 2023. Vol. 6, no 2. P. 349-364 doi: 10.1021/acsabm.2c00891.
5. 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/acsnano.5b00552.
6. 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.
7. Correia JH, Rodrigues JA, Pimenta S, Dong T, Yang Z. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics*. 2021;13:1332. doi: 10.3390/pharmaceutics13091332.
8. Kim TE., Chang JE. Recent studies in photodynamic therapy for cancer treatment: from basic research to clinical trials (Review). *Pharmaceutics*. 2023;15(9):2257. doi: 10.3390/pharmaceutics15092257.
9. Karges J. Clinical development of metal complexes as photosensitizers for photodynamic therapy of cancer. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2022;61:e202112236. doi: 10.1002/anie.202112236.
10. Crous A, Abrahamse H. Photodynamic therapy of lung cancer, where are we? *Front Pharmacol*. 2022; 30:13:932098. doi: 10.3389/fphar.2022.932098.
11. Zinchenko VA, Chashchyna LI. [Possible mechanisms of resistance of tumor cells to radiation and chemotherapy]. *Biopolymers and the cell*. 2005; 21 (6):473-84. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00070D>. Ukrainian.
12. Talko W, Lavrenchuk GYo, Pochapinskiy OD, Atamaniuk NP, Chernyshov AV. Efficiency of photon capture beam technology and photodynamic impact on malignant and normal human cells in vitro. *Problems of Radiation Medicine and Radiobiology*. 2022;27:234-48. doi: 10.33145/2304-2022-27-234-248.
13. [Animal cell in culture (Methods and application in biotechnology)] / ed. LP Dyakonov. M.: «Sputnik +», 2009. 656 p. Russian.
14. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN [Statistical methods in biomedical research using Excel]. 2nd ed. K.: MORION, 2001.408 p. Russian
15. Pochapinskiy 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.
16. Hak A, Ali MS, Sankaranarayanan SA, Shinde VR, Rengan AK. Chlorin e6: a promising photosensitizer in photo-based cancer nanomedicine. *ACS Appl Bio Mater*. 2023;6(2):349-64. doi: 10.1021/acsabm.2c00891.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Лавренчук Галина Йосипівна – доктор біологічних наук, професор, завідувачка лабораторії клітинної радіобіології Інституту експериментальної радіології ДУ «Націо-

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Halyna Y. Lavrenchuk – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Cellular Radiobiology Laboratory, Experimental Radiology Institute, SI «National Research

нальний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ, Україна, ORCID ID: 0000-0001-7200-712X

Только Вікторія Василівна – доктор медичних наук, професор, директор Інституту експериментальної радіології, завідувачка відділу радіобіології Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ, Україна, ORCID ID: 0000-003-2073-8427

Чернишов Андрій Вікторович – кандидат медичних наук, науковий співробітник лабораторії клітинної радіобіології Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ, Україна, ORCID ID: 0000-0002-9564-759X

Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine, ORCID ID: 0000-0001-7200-712X

Victoria V. Talko – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of Institute of Experimental Radiology, Head Radiobiology Department, Institute of Experimental Radiology SI «National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine, ORCID ID: 0000-003-2073-8427

Andriy V. Chernyshov – Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Cell Radiobiology Laboratory, Experimental Radiology Institute, SI «National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine, ORCID ID: 0000-0002-9564-759X

Стаття надійшла до редакції 28.08.2023

Received: 28.08.2023