

Е.В. Плотников^{1,2,3}, М.В. Белоусов^{1,2}, А.Г. Дрозд¹, К.С. Бразовский¹,
М.С. Ларькина^{1,2}, Е.С. Сухих¹, А.А. Артамонов⁴, И.В. Ломов¹, В.И. Чернов^{1,5}

ИЗУЧЕНИЕ РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ АСКОРБАТА ЛИТИЯ ПРИ НЕЙТРОННОМ ОБЛУЧЕНИИ НА МОДЕЛЯХ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

¹ Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск

² Сибирский государственный медицинский университет, Томск

³ НИИ психического здоровья Томского национального исследовательского
медицинского центра РАН, Томск

⁴ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

⁵ НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Томск

Контактное лицо: Е.В. Плотников, e-mail: plotnikovev@tpu.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Радиорезистентность опухолевых клеток представляет собой серьезную проблему в лечении онкологических заболеваний, что, наряду с повреждающим действием облучения на здоровые ткани, существенно лимитирует возможности лучевой терапии. Поэтому важной задачей современной онкофармакологии является поиск и исследование новых радиосенсибилизирующих соединений. Основная цель данного исследования состояла в изучении радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития в условиях *in vitro* и *in vivo* при воздействии нейтронного излучения.

Материал и методы: Оценка биологического действия *in vitro* выполнялась на клеточной культуре опухолевой линии НСТ-116 (колоректальный рак человека). Для создания модели опухолевого роста *in vivo* в работе использовали SPF мышей нудов иммунодефицитной линии Nu/J. Ксенографты *in vivo* формировали путем подкожной инъекции суспензии клеток линии НСТ-116 в концентрации 2 млн кл./100 мкл. Препарат животным вводили перед облучением путем в/б инъекции в физиологическом растворе из расчета 2,4 мМ/кг. Нейтронное облучение клеток проводили на циклотроне Р-7М потоком нейтронов со средней энергией 7,5 MeV в диапазоне поглощенных доз 0,5–1,5 Гр. Локальное облучение опухолей у мышей проводили однократно в дозе 1,5 Гр на циклотроне с аналогичными параметрами потока нейтронов. Оценка жизнеспособности клеток проводили с помощью МТТ теста. Параметры опухолевого роста оценивали путем измерения геометрических размеров опухоли и расчета среднего объема, времени удвоения опухолей и продолжительности жизни животных.

Результаты: Показано усиление цитотоксического эффекта при сочетанном применении лучевого воздействия и аскорбата лития *in vitro* и *in vivo*. Установлено дозозависимое снижение жизнеспособности опухолевых клеток при использовании аскорбата лития в концентрации 0,1–0,3 мМ в сочетании с нейтронным облучением. Показано уменьшение среднего объема опухоли более чем на 50 % в сравнении с контролем, замедление скорости роста опухолей до 72 % и увеличение медианной продолжительности жизни экспериментальных животных на 86 % при сочетанном применении аскорбата лития и нейтронного облучения. Предложены механизмы радиосенсибилизирующего воздействия путем индукции окислительного стресса.

Заключение: Применение аскорбата лития приводит к более выраженному терапевтическому эффекту лучевого воздействия на клеточных и организменных моделях опухолевого роста.

Ключевые слова: аскорбат лития, радиосенсибилизация, модели опухолевого роста, колоректальный рак, клетки линии НСТ-116, нейтроны, цитотоксичность, апоптоз

Для цитирования: Плотников Е.В., Белоусов М.В., Дрозд А.Г., Бразовский К.С., Ларькина М.С., Сухих Е.С., Артамонов А.А., Ломов И.В., Чернов В.И. Изучение радиосенсибилизирующих свойств аскорбата лития при нейтронном облучении на моделях опухолевого роста // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69. № 4. С. 5–12. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-4-5-12

E.V. Plotnikov^{1,2,3}, M.V. Belousov^{1,2}, A.G. Drozd¹, K.S. Brazovsky¹,
M.S. Larkina^{1,2}, E.S. Sukhikh¹, A.A. Artamonov⁴, I.V. Lomov¹, V.I. Chernov^{1,5}

Study of Radiosensitising Properties of Lithium Ascorbate under Neutron Irradiation in Tumour Growth Models

¹ National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³ Mental Health Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia

⁴ Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia

⁵ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia

Contact person: E.V. Plotnikov, e-mail: plotnikovev@tpu.ru

ABSTRACT

Background: Radiosensitivity of tumour cells is a serious problem in the treatment of oncological diseases, which, along with the damaging effect of irradiation on healthy tissues, significantly limit the possibilities of radiation therapy; therefore, an important task of modern

oncopharmacology is the search and study of new radiosensitizing compounds. The main objective of this study was to investigate the radiosensitising effect of lithium ascorbate *in vitro* and *in vivo* under neutron radiation exposure.

Material and methods: Evaluation of biological effect *in vitro* was performed on cell culture of tumour line HCT-116 (human colorectal cancer). To develop a model of tumour growth *in vivo*, SPF-nude immunodeficient mice (line Nu/j) were used. *In vivo* xenografts were formed by subcutaneous injection of cell suspension of HCT-116 cell line at a concentration of 2 million cells per 100 μ l. The drug was administered to animals before irradiation by intraperitoneal injection in physiological solution at the rate of 2.4 mM/kg of animal weight. Neutron irradiation of cells was performed on cyclotron P-7M, by neutron flux with average energy of 7.5 MeV in the range of absorbed doses of 0.5–1.5 Gy. Local irradiation of mice tumours was performed once at a dose of 1.5 Gy on a cyclotron with the same flux parameters. Cell viability was assessed by MTT test. Tumour growth parameters were assessed by measuring the sizes of xenografts and calculating the average volume, tumour doubling time and animal life span.

Results: Enhancement of cytotoxic effect with combined application of radiation exposure and lithium ascorbate *in vitro* and *in vivo* was shown. A dose-dependent decrease in cancer cell viability was found when lithium ascorbate was used at a concentration of 0.1–0.3 mM in combination with neutron irradiation. It was shown that the average tumour volume decreased by more than 50 % in comparison with the control, the xenografts growth rate slowed down to 72 %, and the median life expectancy of experimental animals increased by 86 % when lithium ascorbate and neutron irradiation were combined. Mechanisms of radiosensitising effect by induction of oxidative stress were proposed.

Conclusion: The use of lithium ascorbate results in a more pronounced therapeutic effect of neutron radiation exposure in cellular and animal models of tumour growth.

Keywords: lithium ascorbate, radiosensitization, tumor growth models, colorectal cancer, HCT-116 cells, neutron, cytotoxicity, apoptosis

For citation: Plotnikov EV, Belousov MV, Drozd AG, Brazovsky KS, Larkina MS, Sukhikh ES, Artamonov AA, Lomov IV, Chernov VI. Study of Radiosensitising Properties of Lithium Ascorbate under Neutron Irradiation in Tumour Growth Models. Medical Radiology and Radiation Safety. 2024;69(4):5–12. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-4-5-12

Введение

Несмотря на значительные достижения современной онкологии, ежегодно от рака умирает более 9 млн чел., что делает его второй ведущей причиной смертности в мире. Прогнозы распространения онкозаболеваний в популяции предполагают, что к 2040 г. в мире ежегодно будет регистрироваться около 30 млн новых случаев заболевания и более 16 млн смертей [1]. Столь тяжелые последствия требуют повышения эффективности и новых подходов к лечению онкологических заболеваний. В настоящее время с этой целью широко применяется лучевая терапия, ввиду высокой эффективности и возможности простого комбинирования с другими видами лечения [2]. Однако есть и серьезные ограничения в применении лучевой терапии, связанные с серьезными побочными эффектами, радиотоксичностью и повышением устойчивости опухолевых клеток.

Основными задачами для повышения эффективности лучевой терапии являются минимизация радиотоксичности для здоровых тканей и повышение радиочувствительности опухоли. Разрабатываются различные подходы и способы достижения этих целей, в том числе оптимизация формы и зоны облучения и фракционирование доз. Эффективным фармакологическим подходом является применение радиосенсибилизаторов, т.е. веществ, повышающих радиочувствительность опухоли. Зачастую общая доза терапевтического облучения недостаточна, чтобы радикально уничтожить опухоль, именно потому, что при увеличении дозы неприемлемо возрастает уровень повреждения нормальных тканей. Радиосенсибилизаторы в этом контексте позволяют сместить баланс в сторону большей эффективности при меньшей поглощенной дозе, таким образом являются важными химиопрепаратами, повышающими эффективность лучевой терапии при минимальных затратах и изменениях плана терапии. В идеальном варианте радиосенсибилизаторы должны повышать чувствительность опухоли без воздействия на нормальные клетки [3]. Это крайне сложная задача, требующая сочетания у препарата противоположных свойств. Несмотря на то, что существующие радиосенсибилизирующие препараты повышают чувствительность опухолевых клеток к облучению, их широкое клиническое применение по-прежнему ограничено

вследствие наличия значительных собственных побочных реакций в сенсибилизирующих дозах.

При рассмотрении радиосенсибилизирующего эффекта важно учитывать не только свойства перспективного соединения, но и природу применяемого излучения. Различные виды ионизирующего излучения значительно отличаются по своему биологическому воздействию на живые объекты. В медицинской практике наиболее распространенными являются источники фотонного излучения (рентгеновское и гамма-излучение). При этом в ряде случаев определенное преимущество имеет корпускулярное излучение (например, нейтронное). Нейтроны обладают уникальными радиобиологическими свойствами и оказывают более сильное биологическое воздействие на клетки по сравнению с фотонным излучением в эквивалентной поглощенной дозе, что делает их более эффективными для уничтожения некоторых опухолей, в т.ч. радиорезистентных и трудно поддающихся лечению с помощью обычной фотонной лучевой терапии [4–6].

Одним из фундаментальных механизмов реализации эффектов лучевой терапии на клеточном уровне является повреждение ДНК. Биологические макромолекулы повреждаются как первичным воздействием излучения, так и вторичным действием свободных радикалов, массированно образующихся вследствие радиолитического распада воды. Радиационно-индуцированный окислительный стресс является основным источником критических повреждений, приводящих к гибели клетки по некротическому или апоптотическому пути. Иницирование апоптоза играет решающую роль в эффективности противоопухолевого лечения; однако злокачественные клетки обладают определенным уровнем устойчивости к апоптозу вследствие накопления мутаций. Таким образом, внешняя активация апоптоза может повысить восприимчивость злокачественных клеток к ионизирующему излучению и уменьшить общие побочные эффекты радиационного облучения. В целом можно повысить радиочувствительность злокачественных клеток за счет использования соединений, которые генерируют свободные радикалы, препятствуют синтезу ДНК и нарушают механизмы репарации [7].

В этой связи интересны свойства некоторых солей лития с прооксидантной активностью, в частности

аскорбата лития. В ряде работ показаны его радиосенсибилизирующие и апоптоз-индуцирующие свойства [8, 9]. Важно отметить, что препараты лития имеют долгую историю эффективного применения в психиатрии, поэтому потенциальные побочные эффекты и фармакокинетика лития хорошо известны. С другой стороны, витамин С также является хорошо изученным препаратом, с известным фармакокинетическим профилем и низкой токсичностью. Зависимость доза–эффект для некоторых антиоксидантов носит куполообразный характер. Примечательно, что в определенных условиях эти антиоксиданты могут действовать как прооксиданты, что подчеркивает сложный характер их биохимической активности. Этот феномен был подробно изучен в случае аскорбиновой кислоты и ее солей [10]. Предполагается, что повышенная концентрация аскорбат-анионов в области облучения может повысить степень окислительного стресса, вызванного ионизирующим излучением.

Данная работа ставит целью изучение радиосенсибилизирующих эффектов аскорбата лития в сочетании с нейтронным облучением *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методы

Объект исследования – аскорбат лития, был синтезирован в реакции аскорбиновой кислоты и карбоната лития (реагенты ACS от Sigma-Aldrich), как описано в работе [9]. Полученный белый порошок, отличающийся характерной кристаллической структурой, проверялся на подлинность ИК-спектрометрией и был использован для дальнейших экспериментальных исследований. Полученное соединение соответствовало формуле аскорбата лития дигидрата $\text{LiC}_6\text{H}_7\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Клеточные культуры

В качестве биологического объекта для изучения радиосенсибилизирующих свойств аскорбата лития *in vitro* использовали стандартизованную культуру клеток колоректального рака человека (HCT-116). Данная линия клеток характеризуется относительно высокой радиочувствительностью и широко используется в качестве тестовой клеточной модели опухолевого роста для изучения различных эффектов [11].

Клетки HCT-116 культивировали в стандартной среде RPMI 1640. В среду вносили обогащающие добавки (10 % эмбриональную бычью сыворотку, глутамин и антибиотики (смесь пенициллин/стрептомицин)). Клетки использовали в экспериментах в фазе экспоненциального роста на третьем пассаже после выведения из криоконсервации. Для выполнения экспериментов суспензию клеток вносили в лунки 96-луночного планшета в концентрации 1,5 тыс./лунка и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C, в увлажненной атмосфере с 5 % уровнем CO_2 . Рабочие концентрации препарата для экспериментов получали путем растворения в клеточной питательной среде RPMI-1640. Готовили серию концентраций 0–0,8 мМ, которые вносили в лунки 96-луночного планшета с предварительно засеянными опухолевыми клетками. Далее проводили облучение.

Облучение клеточных культур

В качестве источника нейтронов использовался циклотрон Р-7М (ТПУ, Томск, РФ). В ходе эксперимента клетки подвергались облучению нейтронами со средней энергией 7,5 МэВ и плотностью потока $2,6 \times 10^7$ н/см² × сек, которые генерировались из бериллиевой мишени, облученной дейтронами с энергией 13,6 МэВ. Облучение клеток проводили в 96-луночных планшетах

до накопления соответствующей поглощенной дозы 0,5–1,5 Гр, после чего клетки инкубировали в течение 72 ч в стандартных условиях (37 °C, 100 % влажность, 5 % CO_2).

Оценка жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста через 72 часа после облучения. Для проведения МТТ-теста использовали 96-луночные планшеты с клетками после проведения всех экспериментальных процедур. В каждую лунку добавили раствор МТТ (концентрация 0,45 мг/мл), инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 в течение 4 ч до образования кристаллов формазана в клетках контрольной группы, что фиксировалось визуально при помощи оптического микроскопа. Далее удаляли раствор из всех лунок, добавляли в каждую лунку 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) для растворения кристаллов формазана. Встряхивали планшеты на шейкере в течение 2 мин.

Измерение оптической плотности проводили на микропланшетном спектрофотометре Multiscan FS (ThermoFisher) при длине волн 570 нм, в качестве референса измеряли оптическую плотность при длине волны 620 нм. Из полученных значений при 570 нм вычитали значения при 620 нм. Обработку данных проводили путем усреднения значений оптической плотности в нескольких параллелях, после чего рассчитывали жизнеспособность в процентах от необлученной контрольной группы (принятой за 100 %).

Экспериментальные животные

В работе использовали SPF мышей-нудов иммунодефицитной линии Nu/J (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, РФ). Для эксперимента использовали самок в возрасте 8 нед. Животных содержали в контролируемых условиях группами по 5–6 особей в стерильных вентилируемых шкафах (Aria BIO-C36, Tecniplast s.p.a, Италия), при температуре 23–24 °C, относительной влажности 30–50 % и световом режиме 12/12 ч день/ночь. Животные обеспечивались свободным доступом к корму (Mucedola, Италия) и очищенной питьевой воде *ad libitum*. Содержание, манипуляции и эксперименты с животными были одобрены биоэтической комиссией (протокол ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России IACUC №1 от 27.09.2022).

Получение модели опухолевого роста (опухолевого ксенографта) *in vivo*

Опухолевый ксенографт выращивали с использованием гипоиммунных мышей линии Nu/J, которым прививались суспензия из клеток колоректального рака человека линии HCT-116 в количестве 2×10^6 клеток в 0,1 мл в правую заднюю лапу. В течение недели проводили наблюдение роста ксенографтов и при достижении среднего объема опухоли 100 мм³ мышей ввели в эксперимент. Мыши рандомизированно распределялись по экспериментальным группам по 8 животных. Были установлены условия выведения из эксперимента, которыми являлись достижение размеров опухоли выше 1000 мм³, признаки хронической боли (корчи, пассивность), потеря массы тела более 20 процентов, изъязвление опухоли. В ходе эксперимента состояние мышей наблюдалось и фиксировалось каждые 2 дня согласно протоколу оценки параметров опухоли и состояния животных. Животных выводили из эксперимента в соответствии с требованиями гуманного обращения с животными путем передозировки CO_2 и последующей цервикальной дислокацией.

Экспериментальная терапия и облучение опухолей *in vivo*

Перед облучением мышам вводился аскорбат лития из расчета 2,4 мМ/кг внутривенно в физиологическом растворе в объеме 200 мкл. Контрольным группам вводился физраствор внутривенно в объеме 200 мкл. Локальное облучение опухолей проводили однократно в дозе 1,5 Гр на циклотроне. Для этого мышь помещали в фиксатор и через коллиматор направляли излучение только на зону опухоли. Тело животного было закрыто защитным экраном и не подвергалось облучению. После однократного облучения животные переводились в обычные условия содержания, описанные выше.

Оценка параметров опухоли и состояния животных

Оценка состояния животных проводилась один раз в 2 сут, учитывали поведение животных, проявления боли, наличие язв и воспалений. Животные взвешивались с погрешностью до 0,1 г. Измерение физического размера опухолей проводили через день при помощи штангенциркуля в двух проекциях. На основании этих данных рассчитывали объем опухоли по следующей формуле:

$$V = A \times B^2 \times 0,5, \quad (1)$$

где, V – объем опухоли (мм³); A – длина опухоли (или наибольший диаметр) (мм); B – ширина опухоли (или диаметр, перпендикулярный длине) (мм).

Степень торможения роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле:

$$\text{ТРО, \%} = (V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}) / V_{\text{контроль}} \times 100, \quad (2)$$

где V – объем опухоли (мм³)

Время удвоения опухоли (ВУ) рассчитывали по формуле:

$$\text{ВУ} = \Pi \times \log(2) / (\log(KO) - \log(НО)), \quad (3)$$

где, Π – продолжительность наблюдения (сут), KO – конечный объем опухоли в последний день наблюдения, $НО$ – начальный объем опухоли в первый день наблюдения.

Статистическая обработка результатов

Обработку результатов исследований выполняли с помощью программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, CA, USA). Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Для сравнения данных в контрольных и экспериментальных группах использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

In vitro тестирование

В эксперименте изучено радиосенсибилизирующее действие аскорбата лития в диапазоне концентраций 0,1–0,8 мМ на опухолевые клетки при различных поглощенных дозах нейтронного излучения (рис. 1).

На рис. 1 показано изменение жизнеспособности клеток НСТ-116 при воздействии нейтронного излучения. Установлено, что при добавлении исследуемого вещества начиная с минимальной концентрации 0,1 мМ жизнеспособность клеток уменьшалась больше чем на 10 % от облученной группы в соответствующей поглощенной дозе. Показана высокая чувстви-

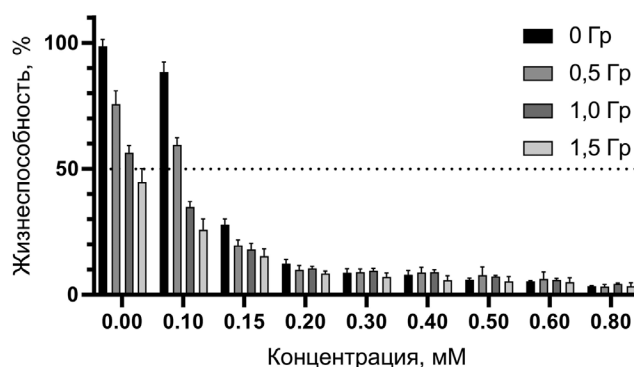


Рис. 1. Изменение жизнеспособности клеток НСТ-116 при воздействии нейтронного излучения (в диапазоне поглощенных доз 0–1,5 Гр) и аскорбата лития в диапазоне концентраций (0–0,8 мМ). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение в процентах от жизнеспособности необлученного контроля без воздействия аскорбата лития

Fig. 1. Changes in the viability of HCT116 cells under the influence of neutron radiation (in the range of absorbed doses of 0–1.5 Gy) and lithium ascorbate in the concentration range (0–0.8 mM). The results are presented as an mean \pm standard deviation as a percentage of the viability of the non-irradiated control without exposure to lithium ascorbate

тельность линии НСТ-116 к нейтронному облучению. В максимальной поглощенной дозе 1,5 Гр снижение жизнеспособности составило более 50 % в группе без применения радиосенсибилизатора (концентрация 0 мМ). Начиная с концентрации 0,3 мМ аскорбата лития, достигается гибель основной популяции клеток при облучении.

In vivo тестирование

Радиосенсибилизирующие свойства аскорбата лития были исследованы на животных моделях опухолевого роста. Животные получали локальное облучение зоны опухоли в поглощенной дозе 1,5 Гр, что соответствует разовой дозе облучения для фракционной лучевой терапии в медицинской практике. Результаты оценки объема опухоли после нейтронного облучения и сочетанного воздействия с применением аскорбата лития на различных временных точках представлены на рис. 2.

В ходе второй недели после облучения наблюдается тенденция изменения среднего объема опухолей по группам, однако, без статистически значимых отличий между группами (рис. 2В). На финальной точке эксперимента (17-е сут) после разового воздействия нейтронного облучения и аскорбата лития отмечено достоверное снижение размера опухолей в экспериментальной группе сочетанного воздействия (рис. 2С). При этом между необлученным контролем и группой с нейтронным облучением без препарата не выявлено статистически значимого отличия, но установлено снижение среднего объема опухолей на 30 % (табл. 1).

На основании полученных данных рассчитано время удвоения опухоли (табл. 2), т.е. время, необходимое растущему новообразованию для удвоения своего объема. В целом более длительное время удвоения свидетельствует о замедлении процесса и более доброкачественном течении. Напротив, короткое время характеризует более агрессивное течение процесса.

Показано увеличение времени удвоения опухоли после воздействия только нейтронным облучением и сочетанием облучения с аскорбатом лития на 14 и 72 %. При этом наблюдается большая индивидуальная вариабельность роста опухоли у отдельных животных. На рис. 3 показаны индивидуальные траектории роста опухолей в группах животных.

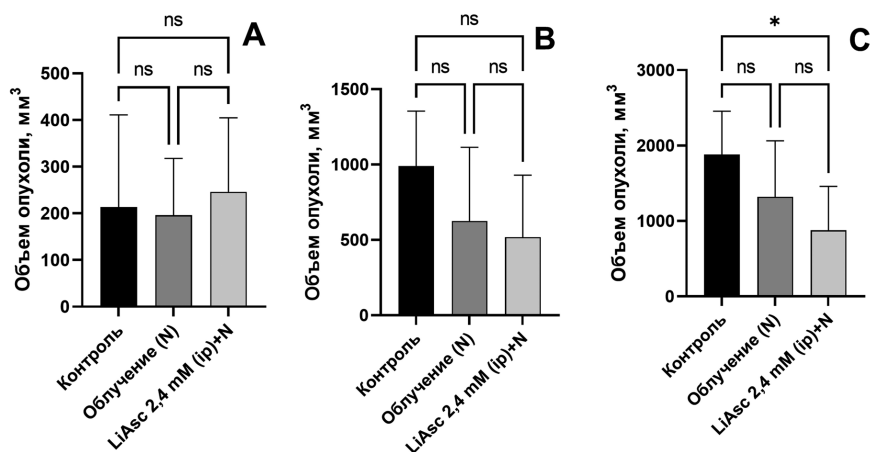


Рис. 2. Средние объемы опухолей по группам на 1 сут (А), 10 сут (В) и 17 сут (С) после терапевтического воздействия. Результаты представлены как среднее значение±стандартное отклонение. * – достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$), ns – нет статистически значимых отличий ($p > 0,05$)

Fig. 2. Mean tumour volumes by group on day 1 (A), day 10 (B) and day 17 (C) after therapeutic intervention. Results are presented as mean±standard deviation. * – significant differences from the control ($p < 0.05$), ns – no statistically significant differences ($p > 0.05$)

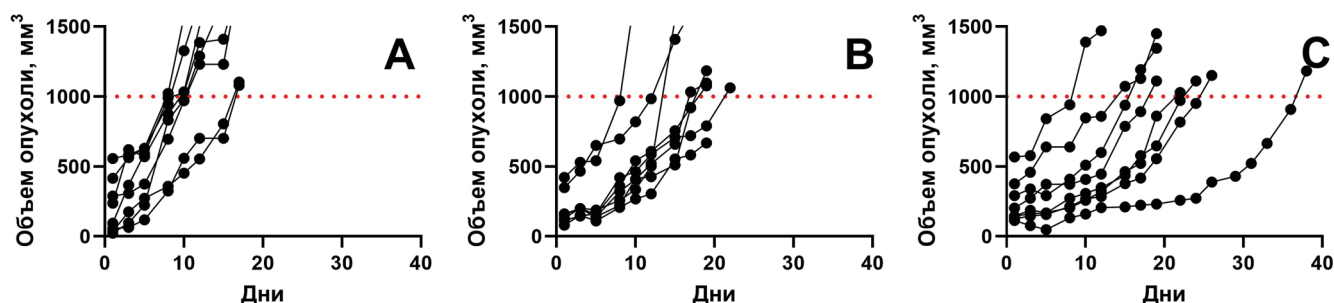


Рис. 3. Индивидуальные траектории роста опухолей в группах животных: А – контроль (без облучения), В – нейтронное облучение (1,5 Гр), С – нейтронное облучение (1,5 Гр) + LiAsc 2,4 мМ (в/б)

Fig. 3. Individual tumour growth trajectories in groups of animals: A – control (no irradiation), B – neutron irradiation (1.5 Gy), C – neutron irradiation (1.5 Gy) + LiAsc 2.4 mM (i/p)

Таблица 1

Степень торможения роста опухоли на 17 сут после облучения и сочетанного воздействия с препаратом. Результаты представлены в процентах от среднего объема опухолей необлученного контроля (принятого за 100 %)

The inhibition of tumor growth on 17-h day after combined exposure of irradiation and the drug. The results are presented as a percentage of the mean tumours volume vs. non-irradiated control (taken as 100 %)

Группа	Нормализованный объем опухоли (от контроля), %	Уменьшение объема опухоли, %
Контроль (без облучения)	100	0
Нейтронное облучение (1,5 Гр)	70	–30
Нейтронное облучение (1,5 Гр) + LiAsc 2,4 мМ (в/б)	47	–53

Таблица 2

Время удвоения опухоли
Tumour doubling time

	Контроль (без облучения)	Нейтронное облучение (1,5 Гр)	Нейтронное облучение (1,5 Гр) + LiAsc 2,4 мМ (в/б)
Время удвоения опухоли, сут	5,4±1,8	6,2±1,0	9,3±2,9

Из данных рис. 3 видно, что обе группы с облучением имеют более пологий наклон кривых роста опухолей, и несмотря на большую индивидуальную вариабель-

ность, это определяет заметное смещение точки вывода из эксперимента вправо и увеличение сроков выживаемости животных после облучения и сочетанного воздействия.

На рис. 4 показана динамика изменения веса животных в ходе эксперимента.

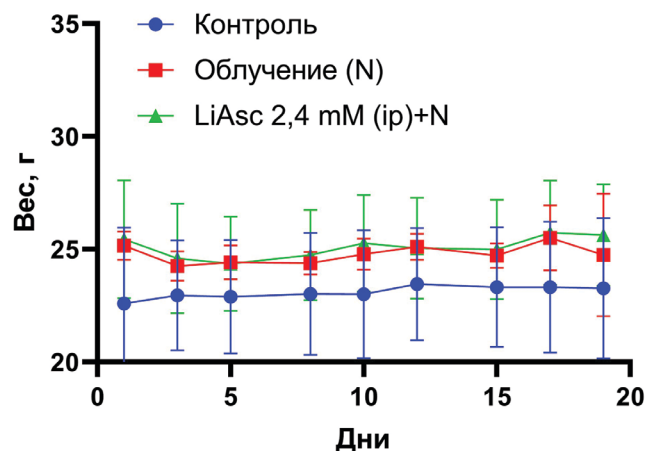


Рис. 4. Динамика изменения веса животных по группам. Результаты представлены как среднее значение±стандартное отклонение.

* – достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

Fig. 4. Dynamics of weight change in animals by groups. Results are presented as mean±standard deviation.

* – significant differences from the control ($p < 0.05$)

Во всех экспериментальных группах отмечается стабильный уровень веса без резких колебаний. Несмотря на активный опухолевый процесс, не отмечено истощения животных и резкого падения веса. В течение эксперимента не отмечалось гибели животных или выведения их из эксперимента по критериям, кроме основного – размера опухоли. На основании данных времени выведения из эксперимента вследствие превышения размера опухоли проведен анализ продолжительности жизни и составлены кривые выживаемости Каплана–Майера для всех групп животных (рис. 5). Медианная продолжительность жизни составила 11 (Q1–Q3, 10–13,25) сут, 18 (Q1–Q3, 15–19) сут и 20,5 (Q1–Q3, 16,5–24,5) сут для контроля, группы облучения (1,5 Гр) и группы облучения (1,5 Гр) + LiAsc 2,4 мМ (в/б) соответственно.

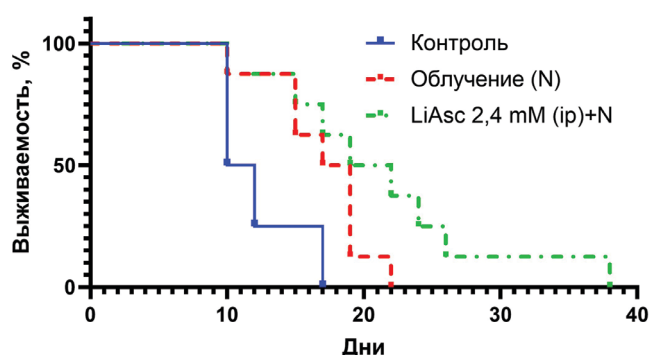


Рис. 5. Кривые выживаемости экспериментальных животных (по методу Каплана–Майера)

Fig. 5. Survival curves of experimental animals (according to the Kaplan-Meier method)

Обсуждение

Аскорбат лития усилил повреждающее воздействие облучения в диапазоне 0,1–0,3 мМ. Установлено достоверное снижение жизнеспособности клеток при сочетанном воздействии в сравнении с облученной группой без воздействия препарата. В концентрации выше 0,3 мМ воздействие приводит к практически полной гибели клеточной культуры, с отдельными выживающими клонами клеток (рис. 1). Установлено высокое цитопатическое действие нейтронного излучения, которое усиливалось при сочетании с аскорбатом лития. При этом сенсибилизирующее действие аскорбата лития проявилось особенно заметно в начальных концентрациях во всем диапазоне поглощенных доз 0,5–1,5 Гр, когда жизнеспособность популяции клеток снизилась более чем на 50 % в концентрации препарата от 0,1 мМ. Эти результаты согласуются с литературными данными, где аналогичный цитотоксический эффект аскорбата лития установлен на других клетках человека при сочетанном применении с другими видами ионизирующих излучений [12].

Важно отметить, что аскорбат обладает способностью резко повышать уровень окислительного стресса [13]. Этот эффект при определенных условиях может синергетически сочетаться с основным повреждающим действием ионизирующего излучения – повышенной продукцией активных форм кислорода вследствие радиолитиза воды. Подобное прооксидантное действие можно рассматривать как основной механизм реализации радиосенсибилизирующего эффекта. Можно ожидать, что окислительное повреждение клеток будет усиливаться при комбинировании с ионизирующим излучением с высоким линейным переносом энергии, например, с нейтронным. Нейтронное излучение является плотно-

ионизирующим, и соответственно вызывает большой биологический эффект в эквивалентной поглощенной дозе [14]. Нейтроны повреждают ДНК и другие структуры клетки как напрямую, так и вторично через радиолитиз воды и продукцию активных форм кислорода (АФК) [15]. В целом, можно предполагать, что в гипоксическом микроокружении опухоли воздействие нейтронного излучения будет более эффективно. При этом прооксидантное действие аскорбата лития индуцирует окислительный стресс, который локально усиливается в зоне опухоли вследствие радиолитиза воды при облучении.

Таким образом, совпадение основных патогенетических повреждающих механизмов усиливает повреждающее действие на клетки, что и подтвердилось в экспериментах *in vitro*. Отметим, что клеточное тестирование соединений *in vitro* не позволяет смоделировать сложную систему биохимических взаимодействий в тканях и микросреду живого организма.

Для изучения потенциального радиосенсибилизирующего эффекта *in vivo* в данной работе были использованы гиподимные мыши с ксенографтами колоректального рака человека. Данные ксенографты имеют стабильный рост и являются широкоиспользуемой моделью опухолевого роста *in vivo*. Важно отметить, что колоректальный рак является третьим по распространенности в мире (уступая только раку молочной железы и легких) с ежегодной смертностью более 1 млн чел. по данным ВОЗ [16]. Обычно в лучевой терапии пациентов в онкологической клинике используют разовые дозы в пределах 1–2 Гр на локальные участки, фракционно, с накоплением суммарной требуемой дозы в течение нескольких недель терапии. В данном эксперименте нами была выбрана схема с однократным облучением зоны опухоли мышей в дозе 1,5 Гр потоком нейтронов (начало эксперимента), с дальнейшим наблюдением динамики опухолевого процесса до достижения объема опухоли свыше 1000 мм³ (точки вывода из эксперимента).

Полученные результаты выявили достоверное уменьшение среднего объема опухолей в группе сочетанного воздействия облучения и аскорбата лития (рис. 2С). В группе с облучением без препарата отмечалось снижение среднего объема опухолей, однако без статистически значимого отличия от показателей необлученной группы животных. На 17 сут эксперимента в группах с разовой дозой облучения 1,5 Гр и облучения 1,5 Гр с препаратом зафиксировали снижение объема опухоли по сравнению с параметрами контрольной группы на 30 и 53 % соответственно (табл. 1).

Безусловно, реакция организма на лучевое воздействие зависит от сочетания ряда факторов, включая скорость репарации ДНК, суммарную дозу, вид излучения, уровень оксигенации и состояние иммунитета. Важной интегральной характеристикой, позволяющей оценить динамику опухолевого процесса, является время удвоения опухоли (ВУ). Средние показатели ВУ на момент окончания эксперимента составляли 5,4, 6,2 и 9,3 сут для контроля, группы облучения и группы облучения с препаратом соответственно (табл. 2). Основываясь на результатах расчета ВУ, можно сделать вывод, что даже при разовой дозе нейтронного облучения в 1,5 Гр, наблюдается значимое замедление процесса роста опухолей (до 72 % при сочетанном воздействии). Особенно выраженное снижение прогрессирования опухоли отмечено в группе сочетанного воздействия. Подобное выраженное ингибирование роста опухоли можно рассматривать только в контексте данной модели ксенографтов колоректального рака, что, конечно, требует дальнейшего изучения и сравнительной оценки на других моделях

и вариантах опухолевого процесса с использованием аскорбата лития. Отметим, что наблюдается значительная индивидуальная вариабельность опухолевого роста у мышей (рис. 3).

Однако в экспериментальных группах с облучением все индивидуальные траектории роста опухолей имеют более пологий наклон, что отражает уменьшение скорости роста в сравнении с контролем. При этом у животных не отмечалось изъязвления и распада опухолей, интоксикации, болевого синдрома, изменений поведения, отказа от пищи или истощения. При оценке динамики веса животных с ксенографтами не выявлено статистически значимых различий между группами на протяжении всего экспериментального исследования (рис. 4). Средняя масса тела испытуемых животных на 17 сут находилась в диапазоне $23,3 \pm 2,9$, $25,5 \pm 1,5$ и $25,7 \pm 2,3$ г для групп контроля, облучения и облучения с аскорбатом соответственно.

Установлено увеличение медианной продолжительности жизни по методу Каплана–Майера в группах облучения и облучения с аскорбатом лития на 64 и 86 % соответственно (рис. 5). Отметим, что продолжительность жизни определялась по времени достижения животным точки выхода из эксперимента (объем опухоли превысил 1000 мм^3), а не физической смерти животного вследствие опухолевого процесса. Это позволяет проводить гуманную и стандартизированную оценку опухолевого процесса и выявить влияние экспериментального воздействия на продолжительность жизни, без возможного влияния кахексии и вторичных процессов на поздних стадиях.

Механизмы замедления роста и регрессии опухоли *in vivo* часто опосредованы иммунными реакциями [17]. В данном случае использованы гипоиmmунные мыши с выключенными Т-клеточными иммунными реакциями (без тимуса), что безусловно минимизирует, хотя и не исключает полностью клеточные иммунные реакции против опухоли. Ранее в ходе экспериментов на клетках было выявлено, что цитотоксическое действие ионизирующего излучения в комбинации с аскорбатом в основном реализуется путем индукции апоптоза в опухолевых

клетках. При одинаковой суммарной поглощенной дозе излучения, опухолевые клетки были более подвержены апоптозу при воздействии сочетанного нейтронного облучения.

Основная предложенная гипотеза радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития заключается в том, что определенные концентрации аскорбата лития в клеточной культуре могут проявлять прооксидантное действие и индуцировать окислительный стресс, синергетически усиливающий действие ионизирующего излучения [12]. Прооксидантным действием объясняется и достаточно выраженное прямое противоопухолевое действие аскорбата [13]. Влияние лития в этом комплексном процессе заключается в ингибировании натрий-зависимых транспортных белков аскорбиновой кислоты (преимущественно, SVCT2) [18]. Блокада транспорта может приводить к локальному избыточному накоплению аскорбата в межклеточном пространстве. В дальнейшем, при превышении физиологической концентрации аскорбата, происходит интенсификация образования перекиси водорода, что усиливается продукцией АФК в результате радиолитиза воды при облучении.

Заключение

В результате работы установлено цитотоксическое действие аскорбата лития на клетки колоректального рака и усиление эффекта при сочетанном применении с нейтронным облучением *in vitro*. Сочетанное действие аскорбата лития и нейтронного облучения *in vivo* в поглощенной дозе 1,5 Гр приводит к снижению объема опухоли и замедлению скорости роста опухоли на животных моделях с опухолевыми ксенографтами колоректального рака человека. Повышение концентрации аскорбата приводит к нарастанию прооксидантного эффекта с генерацией активных форм кислорода, что приводит к локальному усилению окислительного стресса в зоне облучения. Таким образом, аскорбат лития можно рассматривать как перспективное соединение для создания радиосенсибилизаторов с целью применения в лучевой терапии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Abdel-Wahab M., Gondhowiardjo S.S., Rosa A.A., Lievens Y., El-Haj N., Polo Rubio J.A., Prajogi G.B., Helgadottir H., Zubizarreta E., Meghzifene A., Ashraf V., Hahn S., Williams T., Gospodarowicz M. Global Radiotherapy: Current Status and Future Directions-White Paper. *JCO Global Oncology*. 2021;7:827–842. doi: 10.1200/GO.21.00029.
2. Baskar R., Lee K.A., Yeo R. Yeoh K.W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci*. 2012;9, No.3:193-9. doi: 10.7150/ijms.3635
3. Gong L., Zhang Y., Liu C., Zhang M., Han S., Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *Int J Nanomedicine*, 2021;16:1083-1102. doi: 10.2147/ijn.s290438.
4. Liao J.J., Laramore G.E., Rockhill J.K. Neutron Radiotherapy. *Encyclopedia of Radiation Oncology*. Ed. Brady L.W., Yager T.E. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. P. 544–550. doi: 10.1007/978-3-540-85516-3_45.
5. Старцева Ж.А., Грибова О.В., Великая В.В., Сухих Е.С., Лисин В.А., Новиков В.А. Дистанционная нейтронная терапия в Томске: 40 лет на службе онкологии // *Сибирский онкологический журнал*. 2024. Т.23, № 1. С. 98–108. [Startseva Zh.A., Gribova O.V., Velikaya V.V., Sukhikh E.S., Lisin V.A., Novikov V.A. Remote Neutron Therapy in Tomsk: 40 Years in the Service of Oncology. *Sibirskiy Onkologicheskii Zhurnal* = *Siberian Journal of Oncology*. 2024;23;1:98–108 (In Russ.)]. doi: 10.21294/1814-4861-2024-23-1-98-108.
6. Великая В.В., Старцева Ж.А., Лисин В.А., Гольдберг В.Е., Попова Н.О. Аджьювантная нейтронная терапия в комплексном лечении больных первично-метастатическим раком молочной железы // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2022. Т. 67. № 5. С. 64-68. [Velikaya V.V., Startseva Zh.A., Lisin V.A., Goldberg V.E., Popova N.O. Adjuvant Neutron Therapy in the Complex Treatment of Patients with Primary Metastatic Breast Cancer. *Meditinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost* = *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2022;67;5:64-68 (In Russ.)].
7. Pfeffer C.M., Singh A.T.K. Apoptosis: A Target for Anti-cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19;2:448. doi: 10.3390/ijms19020448.
8. Лосенков И.С., Плотноков Е.В., Епимахова Е.В. Цитотоксический и прооксидантный эффекты аскорбата лития *in vitro* // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2018. Т. 1, № 98. С. 24–29. [Losenkov I.S., Plotnikov E.V., Epimakhova E.V. Cytotoxic and Prooxidant Effect of Lithium Ascorbate *in vitro*. *Sibirskiy Vestnik Psichiatrii i Narkologii* = *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*. 2018;1;98:24–29 (In Russ.)]. doi: 10.26617/1810-3111-2018-1(98)-24-29.
9. Tretyakova M.S., Drozd A.G., Belousov M., Brazovskiy K.S., Larkina M.S., Krivoshchekov S., Artamonov A.A., Milochikova I.A., Bezmaga A., Bolshakov A.M., Sukhikh E.S., Plotnikov E. Study of the Radiosensitizing Action of Lithium Ascorbate under Neutron and Photon Irradiation of Tumor Cells. *Drug Development & Registration*. 2023;12;2:185–189. doi: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-185-189.
10. Chen Q., Espey M.G., Sun A.Y., Pooput C., Kirk K.L., Krishna

- M.C., Levine M. Pharmacologic Doses of Ascorbate Act as a Prooxidant and Decrease Growth of Aggressive Tumor Xenografts in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105;32:11105–11109. doi:10.1073/pnas.0804226105.
11. Rajput A., Dominguez San Martin I., Rose R., et al. Characterization of HCT116 Human Colon Cancer Cells in an Orthotopic Model. *J Surg Res*. 2008;147;2:276–281. doi:10.1016/j.jss.2007.04.021.
12. Tretayakova M., Brazovskii K., Belousov M., Artamonov A., Stuchebrov S., Gogolev A., Larkina M., Sukhikh E., Plotnikov E. Radiosensitizing Effects of Lithium Ascorbate on Normal and Tumor Lymphoid Cells under X-ray Irradiation. *Current Bioactive Compounds*. 2023;19;8. doi: 10.2174/157340721966230503094421.
13. Maekawa T., Miyake T., Tani M., Uemoto S. Diverse Antitumor Effects of Ascorbic Acid on Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*. 2022;12. doi: 10.3389/fonc.2022.981547.
14. Jones B. Clinical Radiobiology of Fast Neutron Therapy: What Was Learnt? *Front Oncol*. 2020;10. doi: 10.3389/fonc.2020.01537.
15. Baiocco G., Barbieri S., Babini G., Morini J., Alloni D., Friedland W., Kundrát P., Schmitt E., Puchalska M., Sihver L., Ottolenghi A. The Origin of Neutron Biological Effectiveness as a Function of Energy. *Scientific Reports*. 2016;6;1. doi: 10.1038/srep34033.
16. Vendrely V., Rivin Del Campo E., Modesto A., Jolnerowski M., Meillan N., Chiavassa S., Serre A.A., Gérard J.P., Créhanges G., Huguet F., et al. Rectal Cancer Radiotherapy. *Cancer/Radiothérapie*. 2022;26:272–278. doi: 10.1016/j.canrad.2021.11.002.
17. Patel A.K., Dhanik A., Lim W.K., Adler C., Ni M., Wei Y., Zhong M., Nguyen C., Zhong J., Lu Y.F., Thurston G., MacDonald L., Murphy A., Gurer C., Frleta D. Spontaneous Tumor Regression Mediated by Human T Cells in a Humanized Immune System Mouse Model. *Communications biology*. 2023;6;1:444. doi: 10.1038/s42003-023-04824-z.
18. Hong J.M., Kim J.H., Kang J.S., Lee W.J., Hwang Y.I. Vitamin C Is Taken up by Human T Cells Via Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 2 (SVCT2) and Exerts Inhibitory Effects on the Activation of These Cells in Vitro. *Anat Cell Biol*. 2016;49;2:88–98. doi: 10.5115/acb.2016.49.2.88.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Исследование выполнено в рамках проекта Приоритет 2030.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.
Поступила: 20.03.2024. **Принята к публикации:** 25.04.2024.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study was carried out within the framework of the Priority 2030 project.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.
Article received: 20.03.2024. **Accepted for publication:** 25.04.2024.