

DOI: 10.21294/1814-4861-2021-20-3-56-66

УДК: 616-006.04-091.811-08+615.849.12+612.085.2

Для цитирования: *Каныгин В.В., Касатова А.И., Разумов И.А., Завьялов Е.Л., Кичигин А.И., Мухамадияров Р.А., Таскаев С.Ю.* Оценка эффективности воздействия бор-нейтронозахватной терапии на различные опухолевые и нормальную клеточные культуры. *Сибирский онкологический журнал.* 2021; 20(3): 56–66. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-3-56-66

For citation: *Kanygin V.V., Kasatova A.I., Razumov I.A., Zavjalov E.L., Kichigin A.I., Mukhamadiyarov R.A., Taskaev S. Yu.* Assessment of the effect of boron neutron capture therapy on tumor cell lines and primary embryonic cell culture. *Siberian Journal of Oncology.* 2021; 20(3): 56–66. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-3-56-66

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ НА РАЗЛИЧНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ И НОРМАЛЬНУЮ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

**В.В. Каныгин<sup>1</sup>, А.И. Касатова<sup>1,2</sup>, И.А. Разумов<sup>1,3</sup>, Е.Л. Завьялов<sup>1,3</sup>,  
А.И. Кичигин<sup>1</sup>, Р.А. Мухамадияров<sup>1,4</sup>, С.Ю. Таскаев<sup>1,2</sup>**

ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,  
г. Новосибирск, Россия<sup>1</sup>

Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2. E-mail: yarullinaai@yahoo.com<sup>1</sup>

ФГБНУ «Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера» СО РАН, г. Новосибирск, Россия<sup>2</sup>

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 11<sup>2</sup>

ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск, Россия<sup>3</sup>

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10<sup>3</sup>

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,  
г. Кемерово, Россия<sup>4</sup>

Россия, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6<sup>4</sup>

### Аннотация

**Введение.** В Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН был сконструирован источник нейтронов ускорительного типа с параметрами потока, позволяющими проводить эксперименты по бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ). В основе БНЗТ лежит микроядерная реакция внутри клетки, возникающая в результате поглощения нейтрона стабильным изотопом  $^{10}\text{B}$ . **Целью исследования** явилось определение влияния БНЗТ на опухолевые клеточные линии и на первично-перевиваемую эмбриональную линию с использованием борфенилаланина (BPA), боркаптата (BSH) и липосомального боркаптата в качестве препаратов бора. **Материал и методы.** Клеточные культуры человека: глиобластома (U87), колоректальная аденокарцинома человека (SW-620), меланома человека (SK-Mel28) и первичная эмбриональная клеточная линия были облучены потоком нейтронов в присутствии препаратов бора с концентрацией  $^{10}\text{B}$  40 мкг/мл. **Результаты.** Ранних цитотоксических эффектов облучения (через 2–4 ч) в отношении всех 4 линий клеток при окрашивании трипановым синим обнаружено не было. По данным МТТ и клоногенного тестов наиболее выраженное снижение выживаемости после БНЗТ было отмечено для линий SW-620 и U87 вне зависимости от используемого препарата доставки бора. Для линии SK-Mel28 наилучший цитотоксический эффект был достигнут при облучении с липосомальным боркаптатом. Для первично-перевиваемой эмбриональной линии была выявлена высокая токсичность при проведении БНЗТ с препаратами борфенилаланина и боркаптата. **Выводы.** Анализ полученных данных указывает на эффективность воздействия БНЗТ, проводимой на источнике нейтронов ускорительного типа ИЯФ СО РАН, на опухолевые линии глиобластомы, колоректальной аденокарциномы и меланомы при использовании препаратов борфенилаланин, боркаптит и липосомальный боркаптит.

**Ключевые слова:** бор-нейтронозахватная терапия, ускорительный источник эпитепловых нейтронов, борфенилаланин, боркаптит, липосомы, клеточные линии.

## ASSESSMENT OF THE EFFECT OF BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY ON TUMOR CELL LINES AND PRIMARY EMBRYONIC CELL CULTURE

V.V. Kanygin<sup>1</sup>, A.I. Kasatova<sup>1,2</sup>, I.A. Razumov<sup>1,3</sup>, E.L. Zavjalov<sup>1,3</sup>, A.I. Kichigin<sup>1</sup>, R.A. Mukhamadiyarov<sup>1,4</sup>, S.Yu. Taskaev<sup>1,2</sup>

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia<sup>1</sup>

2, Pirogov Street, 630090, Novosibirsk, Russia. E-mail: yarullinaai@yahoo.com<sup>1</sup>

Budker Institute of Nuclear Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia<sup>2</sup>

11, Lavrentiev ave., 630090, Novosibirsk, Russia<sup>2</sup>

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia<sup>3</sup>

10, Lavrentiev ave., 630090, Novosibirsk, Russia<sup>3</sup>

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia<sup>4</sup>

6, Sosnovy ave., 650002, Kemerovo, Russia<sup>4</sup>

### Abstract

**Introduction.** Boron neutron capture therapy (BNCT) is a promising method for treating tumors, in particular, infiltrative malignant tumors, due to the selective destruction of tumor cells without damaging the surrounding normal tissues. This type of therapy is based on nuclear reaction of neutron capture by stable  $^{10}\text{B}$  isotope. For the successful implementation of BNCT, boron delivery drugs that must be selectively accumulated in malignant cells in a sufficient amount, and a neutron source with the energy required for the neutron capture reaction are needed. At the Budker Institute of Nuclear Physics, the accelerator-based neutron source was designed with flux parameters allowing studies on BNCT to be conducted. **Objective:** to assess the effect of BNCT on tumor and normal cell lines using borphenylalanine (BPA), borcaptate (BSH) and liposomal borcaptat as boron delivery drugs. **Materials and Methods.** Human cell cultures: glioblastoma (U87), colorectal human adenocarcinoma (SW-620), human melanoma (SK-Mel28) and primary embryonic cell lines were irradiated with a neutron flux at the presence of BPA, BSH and liposomal BSH with a concentration of  $^{10}\text{B}$  40  $\mu\text{g/ml}$ . The short-term cytotoxic effect of irradiation was evaluated using trypan blue. Cell survival 96 hours after irradiation was determined using MTT test, and survival fraction was evaluated using the clonogenic test. **Results.** Early cytotoxic effects of irradiation were not observed for all 4 cell lines. According to MTT and clonogenic tests, the most pronounced effect of BNCT was noticed for SW-620 and U87 lines, regardless of boron delivery drug used. For SK-Mel28 line, the best effect was achieved after irradiation with liposomal borcaptate. For the primary transplanted embryonic line, high toxicity was revealed when BNCT was performed with borphenylalanine and borcaptate. **Conclusion.** The data obtained indicate that the accelerator-based BNCT using boron delivery drugs, such as borphenylalanine, borcaptate and liposomal borcaptat, has a positive effect on tumor lines of glioblastoma, colorectal adenocarcinoma and melanoma.

**Key words:** boron neutron capture therapy, accelerator-based neutron source, boronophenylalanine, sodium borcaptate, liposomes, cell lines, trypan blue staining, MTT test, clonogenic test.

### Введение

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) – перспективная методика лечения злокачественных опухолей за счет избирательного уничтожения опухолевых клеток без повреждения окружающих нормальных тканей. В основе данного вида терапии лежит ядерная реакция поглощения нейтрона стабильным изотопом  $^{10}\text{B}$ , в результате чего возникают альфа-частица ( $^4\text{He}$ ) и ядро лития ( $^7\text{Li}$ ), которые обладают высоким темпом торможения и малой длиной пробега, что в 93 % случаев сопровождается выделением  $\gamma$ -кванта. Таким образом, основное повреждающее действие реакции не превышает диаметра одной клетки и делает БНЗТ потенциально идеальным способом таргетного поражения опухоли. Для успешной реализации

метода БНЗТ нужны препараты бора, которые будут селективно накапливаться в новообразовании в достаточном количестве, и источник, обеспечивающий генерацию нейтронов с энергией, необходимой для бор-нейтронозахватной реакции [1].

Большинство клинических исследований было проведено на ядерных реакторах, однако их использование для лечения пациентов по многим причинам было приостановлено, но в первую очередь это связано с недоступностью этих источников для БНЗТ [2]. В мире идет разработка альтернативных источников нейтронов на основе ускорителей заряженных частиц, позволяющих использовать их в лечебных учреждениях. Один из проектов был реализован в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН (ИЯФ СО РАН).

Достигнутые параметры получаемого потока эпитепловых нейтронов позволили провести ряд исследований. Было выполнено облучение клеток глиобластомы человека U87 и нормальных мышечных фибробластов в дозах от 1,9 до 4,1 Гр, в ходе чего выявили активацию клеточной гибели по типу некроза. Однако, по мнению авторов, данные дозы не являются терапевтически эффективными, они сделали предположение, что использование препаратов доставщиков бора может улучшить результат [3]. Эксперименты на клеточных культурах глиального ряда U251, T98G и нормальных клетках китайского хомячка CHO-K1 и V79 показали, что поток нейтронов, формируемый на ускорительном источнике эпитепловых нейтронов в присутствии  $^{10}\text{B}$ , снижает жизнеспособность и клоногенные свойства опухолевых клеток в 3 раза по сравнению с группой облученных клеток без борфенилаланина (BPA) [4]. Влияние потока нейтронов на клетки глиомы человека U251MG *in vitro* после предварительного инкубирования с BPA также угнетает клоногенные свойства клеток. [5]. Отмечается, что уменьшение количества колоний происходит с увеличением концентрации бора, наименьшее количество колоний формируется при концентрации  $^{10}\text{B}$  40ppm при использовании BPA. При этом для V79 доля выживших клеток в 4 раза больше, чем для CHO-K1 и U251 [6]. Была доказана эффективность воздействия БНЗТ на клетки глиомы U251 и меланомы SK-Mel28 после обучения на источнике эпитепловых нейтронов ускорительного типа в присутствии BPA в концентрациях  $^{10}\text{B}$  6,25–50 мкг/мл. При этом мощность дозы составила от 2,7 Гр (ОБЭ) до 9,6 Гр (ОБЭ) [7]. Ещё одно исследование проведено на клеточной линии U87, которую предварительно инкубировали с препаратами бора и затем облучали эпитепловыми нейтронами. Проведенная бор-нейтронозахватная терапия приводила к снижению выживаемости клеток более чем в 2 раза в сравнении с контролем и составила 18 % при инкубировании с BPA и 13 % – с боркаплатом (BSH) [8].

Данная работа посвящена изучению влияния БНЗТ на клеточные линии опухолей человека, ранее задействованные в экспериментах: U87 (глиобластома) и SK-Mel28 (меланома), которые чаще всего использовались при БНЗТ [9]. Кроме того, изучали клетки колоректальной аденокарциномы человека SW-620 [10]. В качестве нормальной, нетрансформированной клеточной линии применяли первичную эмбриональную линию. БНЗТ в данном исследовании проведено с использованием общеупотребимых препаратов BPA и BSH, а также с использованием пегилированных липосом, разрабатываемых для адресной доставки бора в опухолевые клетки.

**Целью исследования** явилась оценка эффективности бор-нейтронозахватной терапии на различные опухолевые и нормальную клеточные

линии, используя обогащенные  $^{10}\text{B}$  BPA, BSH и пегилированную липосомальную форму BSH в качестве препаратов бора и уникальный источник нейтронов ускорительного типа ИЯФ СО РАН.

### Материал и методы

Культуры клеток глиобластомы человека (U87), колоректальной аденокарциномы человека (SW-620), меланомы человека (SK-Mel28) были получены в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ИЦИГ СО РАН. Первичная неиммортилизованная клеточная линия выделена из костно-хрящевой ткани 10-недельного эмбриона, который был получен из Родильного дома № 7 (г. Новосибирск). Ткань механически диспергирована в среде DMEM/F12 и после центрифугирования (10 мин при 1000 об/мин) подвергнута трипсинизации при помощи раствора 1:1 трипсин-версен. Далее клетки культивировали на среде DMEM/F12 (1:1) (Биолот, Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco,

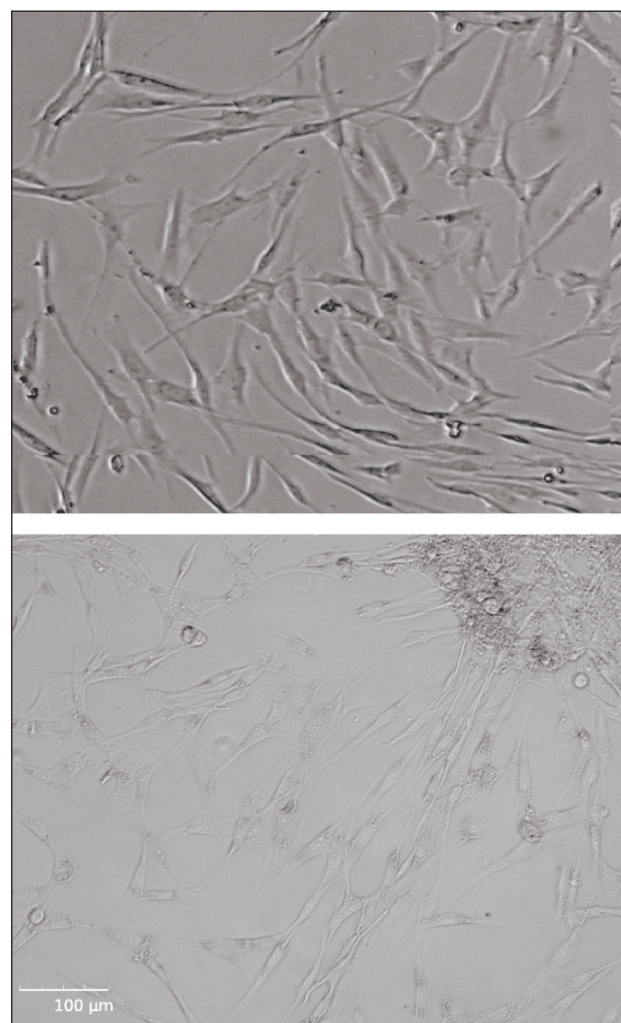


Рис. 1. Прижизненные фотографии клеток первичной эмбриональной линии

Fig. 1. Vital photographs of cells of the primary embryonic cell line



США), с добавлением антибиотика гентамицина 50–100 мкг/мл (Дальхимфарм, Россия) при температуре 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с дотацией 5 % CO<sub>2</sub>. Пересевали клетки, используя раствор трипсин-версен, 2–3 раза в нед в соотношении 1:3–1:5.

На 6-м пассаже провели определение эффективности клонирования, которая составила 25 % (рис. 1). Доля живых клеток от общего числа – 92 %. Среднее время удвоения клеточной популяции – 30 ч, время логарифмической фазы роста – 48 ч. Клетки использовали в эксперименте на 5–7 пассаже в логарифмическую фазу роста.

Для приготовления раствора борфенилаланина (BPA) на фруктозе использовался L-р-борфенилаланин, обогащенный изотопом <sup>10</sup>B >99,5 %, (Katchem, Чехия), и фруктоза (Sigma-Aldrich, США) в молярном избытке, согласно протоколу Coderre и др. [11]. Раствор боркаптата натрия (BSH), обогащенный изотопом <sup>10</sup>B >99,5 % (Katchem, Чехия), был получен путем разведения в 0,9 % растворе натрия хлорида (Renewal, Россия). Пегилированные липосомы с инкапсулированным обогащенным изотопом <sup>10</sup>B боркаптатом получали методом, описанным ранее [12]. Размер и заряд полученных частиц измеряли при помощи прибора ZetasizerNano ZS90 (UK).

Для каждой клеточной культуры была представлена 1 контрольная группа и 4 опытные: группа БНЗТ с BPA, группа БНЗТ с BSH, группа БНЗТ с липосомальным BSH и группа облучения без препаратов бора. За сутки до проведения БНЗТ в опытные группы добавили препараты бора. Концентрации <sup>10</sup>B в среде составила 40 мкг/мл. Контрольную группу и опытную группу облучения инкубировали без бора. В каждой группе было по 3 культуральных флакона. По окончании времени инкубации среду заменяли на среду без сыворотки в объеме 55 мл (под горло) и BPA, BSH и липосомальный BSH добавили в концентрации <sup>10</sup>B 40 мкг/мл. Горлышко каждого флакона обрачивали парафильмом для герметизации, транспортировали все образцы – как опытные, так и контрольные – в термоизолирующем контейнере, температура в котором находилась в интервале от 26 до 30 °С.

Облучение проводили на ускорительном источнике эпителиальных нейтронов ИЯФ СО РАН [13] при энергии протонов 2,05 МэВ, поток нейтронов располагался в энергетическом диапазоне от 1 до 30 кэВ [14], что является оптимальным для проведения БНЗТ, плотность потока составила 3×10<sup>8</sup> см<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>. Интеграл тока протонов и расчетная поглощенная доза представлены в табл. 1. Обратим

Таблица 1/ Table 1

**Параметры облучения клеток на ускорительном источнике эпителиальных нейтронов: интеграл тока и расчетная поглощенная доза**

**Parameters of cell irradiation using the accelerator-based epithermal neutron source: fluence and calculated absorbed dose**

Клеточная культура/ Cell culture	Группа/ Group	Время (мин)/ Time (min)	Интеграл тока протонов (мА×ч)/ Integral proton current (mA×h)	Поглощенная доза (Гр (ОБЭ))/ Absorbed dose (Gy (RBE))
U87	Без бора/Without boron	8 мин/8 min	0,22	0,94
	BPA	8 мин/8 min	0,22	6
	BSH	8 мин/8 min	0,22	6
	Липосомы с BSH/ Liposomes with BSH	8 мин/8 min	0,22	6
SW-620	Без бора/Without boron	10 мин/10 min	0,27	1
	BPA	8 мин/8 min	0,22	6,1
	BSH	7 мин/7 min	0,21	5,8
	Липосомы с BSH/ Liposomes with BSH	7 мин/7 min	0,22	6
SK-Mel 28	Без бора/Without boron	9 мин/9 min	0,22	1
	BPA	7 мин/7 min	0,22	6
	BSH	9 мин/9 min	0,22	6
	Липосомы с BSH/ Liposomes with BSH	7 мин/7 min	0,22	6
Эмбриональные клетки/ Embryonic cells	Без бора/Without boron	10 мин/10 min	0,27	1,1
	BPA	8 мин/8 min	0,22	2,7
	BSH	7 мин/7 min	0,21	2,6
	Липосомы с BSH/ Liposomes with BSH	8 мин/min	0,22	2,7

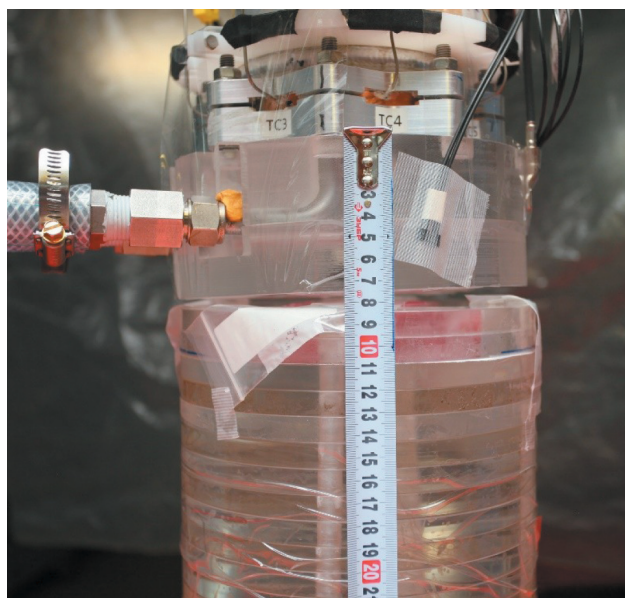


Рис. 2. Positionирование фантома под мишенью  
Fig. 2. Positioning of the phantom under the target

внимание на то, что поглощенная доза выражена в единицах Гр (ОБЭ) (в англоязычных статьях часто используют Gy-Eq), полученная умножением поглощенной дозы компонент ионизирующего излучения на соответствующие коэффициенты относительной биологической эффективности или составной биологической эффективности [2].

Образцы помещали в фантом диаметром 200 мм на вращающейся платформе, верхняя плоскость которого находилась на расстоянии 5 мм от полиметилметакрилатного замедлителя толщиной 74 мм, установленного под нейтроногенерирующую мишень. Толщина замедлителя выбрана с учетом результатов моделирования, в которых на этой глубине в фантоме показано наилучшее терапевтическое соотношение: отношение поглощенной дозы в опухоли к дозе в здоровых тканях. Рядом с образцами располагали детектор-свидетель – золотую активационную фольгу массой 0,1 г (рис. 2). За один подход облучали по 2 флакона, находящихся в ростовой площадке сверху. Во время облучения температура под мишенью составляла 32 °С. Контрольные образцы находились в тех же условиях, что и опытные.

Для определения жизнеспособности через 2–4 ч после облучения клетки опытных и контрольных групп снимали с пластика трипсином, в клеточную суспензию добавляли 0,4 % трипанового синего (Applichem, Германия). Подсчет живых, окрашенных (мертвых) клеток и процент жизнеспособных клеток проводили на автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen), согласно инструкции производителя. Для проведения других клеточных тестов учитывали только количество живых клеток.

Для определения выживаемости через 96 ч после облучения использовали МТТ-тест. При этом все 4 клеточные культуры высевали в 96-луночные

планшеты по  $1 \cdot 10^4$  клеток на лунку по 5 повторов для каждой экспериментальной точки. Через 96 ч в каждую лунку на 100 мкл среды добавляли 20 мкл раствора [3- (4,5-диметилтиазол-2-ил)-5- (3-карбоксиметоксифенил) -2- (4-сульфофенил)-2Н] тетразолия с метазульфатом феназина (Cell Titer 96® AQueous One Solution, Promega, США). Планшеты инкубировали в стандартных условиях в течение 2 ч, оптическую плотность измеряли на BioRad iMark Microplate reader при длине волны 490 нм. Данные представлены как процент выживаемости от контроля.

При оценке пролиферативной активности клеток использовали клоногенный анализ. Клетки высевали по 200 на лунку 12-луночного планшета по 4 повтора для каждой экспериментальной точки, что в итоге составило по 12 повторов на каждую группу. Планшеты культивировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе, мониторируя количество клеток в колониях. На 8–10-е сут в зависимости от линии планшеты промывали физиологическим раствором, клетки фиксировали с помощью 10 % формалина (Panreac AppliChem, Германия), окрашивали раствором Гимза (Sigma, США) и просушивали. Подсчет проводился при помощи светового инвертированного микроскопа Zeiss Primo Vert (Германия), колониями считали те, которые содержали более 50 клеток [15]. Расчеты проводили, используя следующие формулы:

$$\text{Эффективность посева} = \frac{\text{количество колоний}}{\text{количество высеванных клеток}}$$

$$\text{Доля выживших клеток} = \frac{\text{эффективность посева эксперимент}}{\text{эффективность посева контроль}} \times 100 \%$$

Результаты сравнивали с данными контрольных групп.

Полученные значения выражали как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Статистическую обработку данных проводили с помощью языка программирования Python 3 (библиотеки NumPy, SciPy) с использованием U-критерия Манна–Уитни при уровне достоверности 95 % ( $p < 0,05$ ).

### Результаты

Жизнеспособность клеток после окрашивания трипановым синим в группах опухолевых клеток составила  $98\text{--}99 \pm 1 \%$ , а нормальных клеток –  $91 \pm 3,6 \%$ , что может быть связано с особенностями культуры. Процент жизнеспособных клеток до и после облучения достоверно не отличался во всех группах клеток (табл. 2).

Через 96 ч после облучения оценивали МТТ-тест для определения функции митохондрий, данные выражали как процент выживаемости относительно необлученного контроля. В группах облучения без препаратов бора выживаемость всех четырех линий значимо не отличалась от контроля, тогда как в группах БНЗТ выживаемость снижалась. В группе БНЗТ с ВРА выживаемость значительно снижалась для клеток U87 (63 %), SW-620 (90 %) и эмбриональной неопухолевой первичной

Таблица 2/ Table 2

**Жизнеспособность клеток (окрашивание трипановым синим)  
оценивали в течение 2–4 ч после облучения**  
**Cell viability (trypan blue staining) assessed within 2–4 hours after irradiation**

Клеточная культура/ Cell culture	Контрольная группа, жизнеспособность/ Control group, viability	Группы после БНЗТ/ Groups after BNCT	Жизнеспособность/ Viability
U87	99 ± 1 %	Облучение/Irradiation	99 ± 1,4 %
		BPA	98 ± 0,7 %
		BSH	97 ± 0,7 %
		Липосомы с BSH/Liposomes with BSH	99 ± 1,4 %
SW 620	99 ± 1 %	Облучение/Irradiation	98 ± 1,5 %
		BPA	98 ± 1,1 %
		BSH	98 ± 0,6 %
		Липосомы с BSH/Liposomes with BSH	98 ± 0,6 %
SK-Mel28	98 ± 1 %	Облучение/Irradiation	99 ± 0,7 %
		BPA	98 ± 0,6 %
		BSH	98 ± 0,7 %
		Липосомы с BSH/Liposomes with BSH	99 %
Эмбриональные клетки/ Embryonic cells	91 ± 3,6 %	Облучение/Irradiation	91 ± 4 %
		BPA	91 ± 1,7 %
		BSH	93 ± 2,6 %
		Липосомы с BSH/Liposomes with BSH	91 ± 1,4 %

линии (56 %). В группе БНЗТ с BSH выживаемость резко снижалась для всех 4 культур и составила для U87 – 48 %, для SW-620 – 85 %, для SK-Mel 28 – 77 %, для эмбриональной первичной линии – 65 %. В группе БНЗТ с липосомальной формой BSH выживаемость всех опухолевых линий значительно снизилась по сравнению с контролем, в отличие от первичной линии, для которой значимого снижения выживаемости не обнаружено (рис. 3).

Клоногенный анализ применяли для оценки пролиферативной функции клеток и их способности образовывать клон после облучения в присутствии бора и без него. Наблюдали за размером колоний и количеством клеток в них. После того, как в необлученной контрольной группе опухолевых линий количество клеток в колонии превысило 50, все группы фиксировали и окрашивали. Первичная линия в силу морфологических особенностей не образовала колоний, которые можно было бы визуальным образом разделить, однако по случайно выбранным полям зрения определялось снижение плотности монослоя (рис. 4)

Доля выживших клеток глиобластомы U87 в группах БНЗТ достоверно уменьшилась более чем в 2 раза: в группе с BPA она составила 29 %, в группе с BSH – 33 %, а в группе липосомального

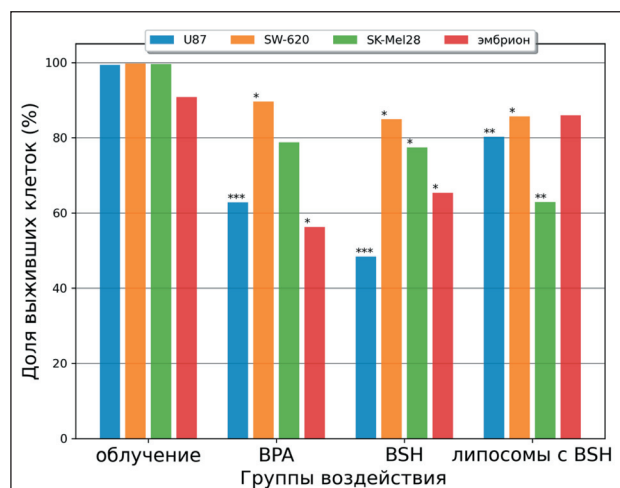


Рис. 3. Определение эффективности воздействия БНЗТ на клетки линий U87, SW-620, SK-Mel 28 и первичную эмбриональную линию при помощи МТТ-теста через 96 ч. Примечание: \* – p≤0,05; \*\* – p≤0,01; \*\*\* – p≤0,001 по отношению к группе контроля в отношении каждой линии

Fig. 3. Determination of the effectiveness of BNCT on cell lines U87, SW-620, SK-Mel 28 and the primary embryonic line using MTT-test after 96 hours.

Note: \* – p≤0.05; \*\* – p≤0.01; \*\*\* – p≤0.001 in relation to the control group of each line



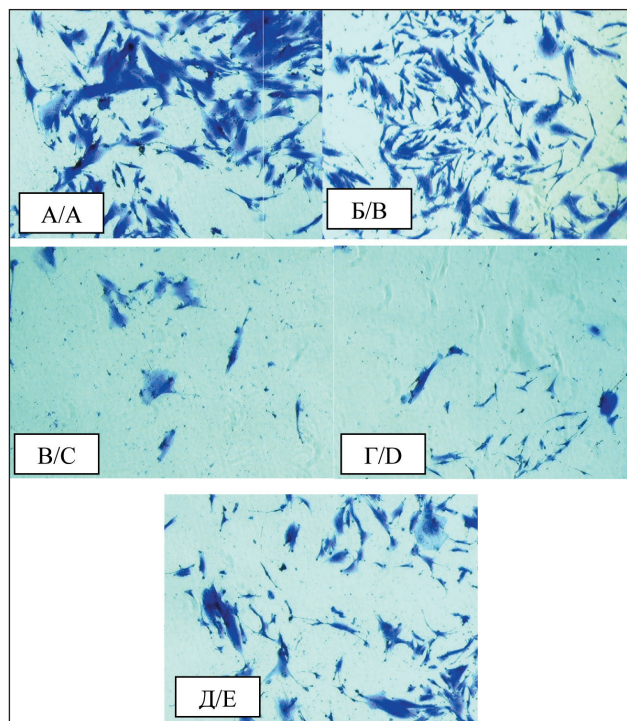


Рис. 4. Фотографии случайно выбранных полей зрения при микроскопическом исследовании первичной эмбриональной линии клеток: А – контроль; Б – облучение; В – БНЗТ с борфенилаланином; Г – БНЗТ с боркапнатом; Д – БНЗТ с липосомальным боркапнатом. Низкая адгезивная способность клеток не позволяет сформироваться колониям, но вместе с тем визуализируется уменьшение плотности клеток в группах после проведения БНЗТ

Fig. 4. Photographs of randomly selected fields of view during microscopic analysis of the primary embryonic cell line: A – control, B – irradiation, C – BNCT with BPA, D – BNCT with BSH, E – BNCT with liposomal BSH. Low adhesive capacity of cells does not allow for colonies, however, a decrease in cell density in groups after BNCT is visualized

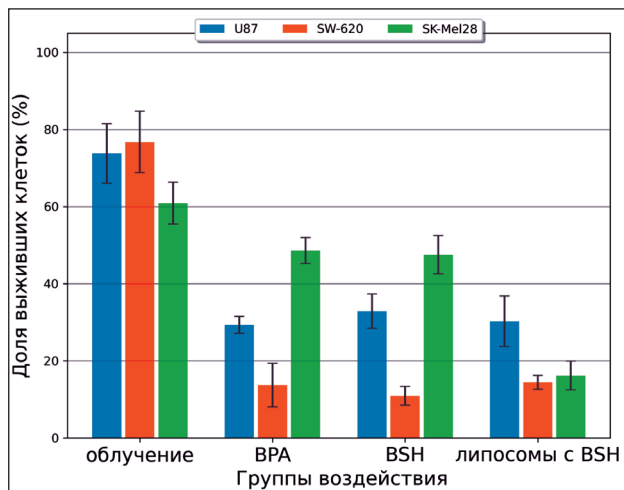


Рис. 5. Результаты клоногенного анализа через 8–10 сут после облучения: на гистограмме показана доля выживших клеток линий U87, SW-620, SK-Mel 28. Все значения, полученные в опытных группах, значительно отличались от группы контроля ( $p \leq 0,05$ )

Fig. 5. Results of clonogenic analysis 8–10 days after irradiation: the histogram shows surviving fraction of cells lines U87, SW-620, SK-Mel 28. All values obtained in the experimental groups differed from those obtained in the control group ( $p \leq 0.05$ )

BSH – 30 %. Жизнеспособность клеток линии колоректальной аденокарциномы SW-620 уменьшилась более чем на 80 % и для групп с BPA, BSH и липосомальным BSH составила 14 %, 11 % и 14 % соответственно. Похожие результаты достигнуты для линии меланомы SK-Mel 28: доля выживших клеток снизилась значительно и составила в группах БНЗТ с BPA – 49 % и с BSH – 48 %. Для этой линии наилучшие значения получены при облучении с липосомальным BSH: доля выживших клеток в этой группе равна 16 % (рис 5).

**Обсуждение**

В данной работе 3 клеточные культуры, полученные из опухолей человека, были облучены потоком нейтронов в присутствии исследуемых препаратов бора с концентрацией  $^{10}\text{B}$  40 мкг/мл и проведено сравнение эффективности воздействия. Одна из них U87 – глиобластома человека, которая часто используется для создания орто- и гетеротопического ксенотрансплантата глиобластомы у мышей линии SCID и Nu/J [13, 17]. Также использована линия меланомы человека SK-Mel 28, которая продемонстрировала чувствительность к облучению эпителиевыми нейтронами в сочетании с борфенилаланином [7]. Кроме того, была взята линия колоректальной аденокарциномы человека SW-620, так как в исследовании K. Maquyama et al. [17] отмечено эффективное накопление различных липосом, в том числе PEG-липосом с BSH, в клетках мышинной колоректальной карциномы, имплантированной в BALB/c мышей. Первичная линия, имеющая фибробластоподобную морфологию, была выбрана как нормальная, не опухолевая, подходящая, по литературным данным, для того, чтобы оценить эффект воздействия метода не только на опухолевые, но и на здоровые ткани [18, 19].

Все 4 клеточные линии были облучены пучком нейтронов, мощность дозы составила около 1 Гр (ОБЭ), также эти линии были облучены пучком нейтронов в присутствии изотопа  $^{10}\text{B}$ , где итоговая доза была около 6 Гр (ОБЭ) для опухолевых линий и 2,6–2,7 Гр для нормальной эмбриональной первичной линии, контрольная группа получила 0 Гр (ОБЭ).

Наибольшая эффективность при БНЗТ получена в отношении линии SW-620. Тест на выживаемость при окраске трипановым синим, проведенный для выявления ранних цитотоксических эффектов, не показал значимых отличий между результатами опытных и контрольной групп. Вместе с тем в МТТ-тесте отмечено достоверное снижение жизнеспособности во всех 3 группах БНЗТ. Клоногенный тест подтвердил долгосрочный эффект БНЗТ – доля выживших клеток составила менее 15 % в группах, облученных с препаратами бора.

Наименьший эффект БНЗТ был отмечен для линии меланомы. Жизнеспособность при окраске

трипановым синим в опытных и контрольной группах достоверно не отличалась. МТТ-тест, проведенный через 96 ч после облучения, выявил незначительное снижение функции митохондрий и гибель этих клеток в группе облучения, в то время как липосомальная форма BSH оказалась наиболее токсичной для клеток меланомы. При клоногенном анализе отмечено, что в группах БНЗТ с ВРА и BSH доля выживших клеток снизилась лишь на 51,5 и 52,5 % соответственно, однако в группе с липосомальным BSH она снизилась на 84 %. Таким образом, оба теста подтверждают наибольшую эффективность липосомальной формы доставки бора для БНЗТ в сравнении со стандартными борсодержащими препаратами для линии SK-MEL-28.

Напротив, в исследовании A.E. Rossini et al. [20], проведенном на ядерном реакторе RA-3, выживаемость при 2 Гр (ОБЭ) при взаимодействии нейтронов в присутствии борфенилаланина с концентрацией  $^{10}\text{B}$  10 мкг/мл составила 20 % для линии меланомы Mel-J и 4 % для M8. Данные различия могут быть объяснены, во-первых, отсутствием общепринятой методики достоверного измерения поглощенной дозы при недостаточной определенности коэффициентов относительной биологической эффективности или составной биологической эффективности. Во-вторых, особенностями клеточных культур, полученных из разных типов опухолей (Mel-J – метастаз меланомы в легкое, M8 – кожная меланома, SK-MEL-28 – кожная меланома) и от разных пациентов, следовательно, имеющих разные гистотипы, что может влиять на способность накапливать бор [9, 21]. Так, в работе M. Caprano et al. [21] на 3 клеточных линиях меланомы человека был продемонстрирован различный характер накопления бора после инкубации с ВРА. Ученые отмечают, что в клинике пациенты, имеющие одинаковый гистологический диагноз «кожная меланома» и одинаковую локализацию опухоли, по-разному отвечают на БНЗТ, что вызывает трудности в стандартизации и оптимизации метода.

В наших предшествующих экспериментах на ускорителе эту линию облучали с ВРА с концентрацией  $^{10}\text{B}$  25 мг/мл, мощность дозы составила 5,7 Гр (ОБЭ), в результате чего ни одной колонии образовано не было [7]. Можно предположить, что модель облучения влияет на выживаемость [22], но это требует дальнейшего изучения.

Для линии U87 ранние цитотоксические эффекты при окраске трипановым синим не обнаружены. При МТТ-тесте на 4-е сут после облучения выявлено достоверное снижение жизнеспособности во всех трех группах БНЗТ. Выживаемость в среднем снизилась на 70 % для всех трех групп БНЗТ по данным клоногенного теста. A. Doi et al. [23] показано, что накопление BSH и липосомального BSH клетками U87 незначительно увеличивалось к 12 ч и затем достигало плато. Авторы проводили облучение группы с BSH через 6 ч после добавле-

ния препарата и через 72 ч после добавления липосом. Тенденция к уменьшению доли выживших клеток у этих 2 препаратов после проведения БНЗТ примерно одинакова, с небольшим преимуществом липосомальной формы боркаптата. В нашей предыдущей работе мы выяснили, что концентрация  $^{10}\text{B}$  после начала инкубации с липосомальным BSH увеличивается, достигая пика к 24 ч, что явилось обоснованием для проведения облучения в это время [24]. В представленном исследовании выживаемость линии U87 для обеих групп также значимо не отличалась.

Через 2–4 ч после БНЗТ выживаемость первичной эмбриональной линии при окрашивании трипановым синим в контрольной и опытных группах значительно не отличалась. МТТ-тест показал, что жизнеспособность достоверно снизилась в группах БНЗТ с ВРА и BSH. На 10-е сут, когда был закончен клоногенный тест для других клеточных линий, отмечалось уменьшение плотности монослоя и для нормальной линии во всех трех группах БНЗТ, особенно в группах с ВРА и с BSH, также изменилась морфология клеток и снизилась степень их адгезии к пластику, что, вероятно, указывает на токсический эффект. Такая высокая радиочувствительность первичной линии может быть связана с тем, что она была получена из эмбриона зародыша [25].

Необходимо отметить, что в группах облучения без препаратов бора также отмечается снижение выживаемости для всех клеточных линий. Это может быть объяснено присутствием гамма-излучения и быстрых и тепловых нейтронов, сопутствующих пучку эпитепловых нейтронов.

В ходе анализа результатов клоногенного теста было выявлено, что доля выживших клеток в опытных группах с препаратами бора снизилась более чем на 50 % для всех трех опухолевых линий, что говорит о значительном влиянии БНЗТ на подавление способности клеток к пролиферации. Эффект БНЗТ на выживаемость клеток линии колоректальной аденокарциномы в клоногенном тесте был наибольший по сравнению с двумя другими опухолевыми линиями. Использование липосомальной формы BSH в качестве агента доставки бора было результативно для линий меланомы. Для других клеточных линий достоверных отличий между используемыми препаратами найдено не было.

### Заключение

Полученные *in vitro* данные говорят об эффективности использования БНЗТ в отношении опухолевых линий глиобластомы, колоректальной аденокарциномы и меланомы с препаратами ВРА, BSH и пегилированной липосомальной формы BSH на источнике нейтронов ускорительного типа ИЯФ СО РАН. Снижение выживаемости клеток эмбриональной линии, отмеченное в эксперименте,



может быть обусловлено ее высокой радиочувствительностью. Использование инкапсулированного в пегелированные липосомы BSH при проведении БНЗТ значительно снижало выживаемость всех 3

опухолевых линий, в то время как для первичной эмбриональной линии значимого цитотоксического эффекта не обнаружено.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Таскаев С.Ю., Каныгин В.В. Бор-нейтронзахватная терапия. Новосибирск, 2016. 216 с. [Taskaev S.Yu., Kanygin V.V. Boron Neutron Capture Therapy. Novosibirsk, 2016. 216 p. (in Russian)].
2. Sauerwein W.A., Wittig A., Moss R., Nakagawa Y. Neutron Capture Therapy: Principles and Applications. Springer, 2012. 543 p.
3. Mostovich L.A., Gubanov N.V., Kutsenko O.S., Aleinik V.I., Kuznetsov A.S., Makarov A.N., Sorokin I.N., Taskaev S.Yu., Nepomnyashchikh G.I., Grigoreva E.V. Effect of Epithelial Neutrons on Viability of Glioblastoma Tumor Cells in Vitro. Bull Exp Biol Med. 2011; 151(2): 264–7. doi: 10.1007/s10517-011-1304-1.
4. Волкова О.Ю., Мечетина Л.В., Таранин А.В., Заборонок А.А., Nakai K., Лежнин С.И., Фролов С.А., Касатов Д.А., Макаров А.Н., Сорокин И.Н., Сычева Т.В., Щудло И.М., Таскаев С.Ю. Влияние нейтронного излучения на жизнеспособность опухолевых клеток, культивируемых в присутствии изотопа бора  $^{10}\text{B}$ . Вестник радиологии и радиологии. 2016; 97(5): 283–8. [Volkova O.Yu., Mechetina L.V., Taranin A.V., Zaboronok A.A., Nakai K., Lezhnin S.I., Frolov S.A., Kasatov D.A., Makarov A.N., Sorokin I.N., Sycheva T.V., Shchudlo I.M., Taskaev S.Yu. Impact of neutron radiation on the viability of tumor cells cultured in the presence of boron-10 isotope. Journal of Radiology and Nuclear Medicine. 2016; 97(5): 283–8. (in Russian)]. doi: 10.20862/0042-4676-2016-97-5-283-288.
5. Zaboronok A., Byvaltsev V., Kanygin V., Iarullina A., Kichigin A., Taranin A., Volkova O., Mechetina L., Taskaev S., Muhamadiyarov R., Zavyalov E., Nakai K., Sato E., Yamamoto T., Mathis B., Matsumura A. Boron-neutron capture therapy in Russia: preclinical evaluation of efficacy and perspectives of its application in neurooncology. New Armen Med J. 2017; 11(1): 6–15. doi: 10.18632/oncotarget.24078.
6. Sato E., Zaboronok A., Yamamoto T., Nakai K., Taskaev S., Volkova O., Mechetina L., Taranin A., Kanygin V., Isobe T., Mathis B.J., Matsumura A. Radiobiological response of U251MG, CHO-K1 and V79 cell lines to accelerator-based boron neutron capture therapy. J Radiat Res. 2018; 59(2): 101–7. doi: 10.1093/jrr/rtx071.
7. Касатова А.И., Каныгин В.В., Разумов И.А., Таскаев С.Ю., Касатов Д.А., Бывальцев В.А. Исследование биологической эффективности борнейтронзахватной терапии на клетках глиомы и меланомы человека. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2020; 64(3): 110–116. [Kasatova A.I., Kanygin V.V., Razumov I.A., Taskaev S.Yu., Kasatov D.A., Byvaltsev V.A. Investigation of the biological effectiveness of boron neutron capture therapy on human glioma and melanoma cells. Pathological Physiology and Experimental Therapy. 2020; 64(3): 110–116. (in Russian)].
8. Бывальцев В.А., Завьялов Е.Л., Каныгин В.В., Касатова А.И., Кичигин А.И., Разумов И.А., Сычева Т.В., Таскаев С.Ю. Цитопатические эффекты бор-нейтронзахватной терапии на ускорительном источнике эпителиальных нейтронов для культуры клеток глиобластомы человека. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18(4): 34–42. [Byvaltsev V.A., Zavyalov E.L., Kanygin V.V., Kasatova A.I., Kichigin A.I., Razumov I.A., Sycheva T.V., Taskaev S.Yu. Cytopathic effects of accelerator-based boron neutron capture therapy on human glioblastoma cells. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18(4): 34–42. (in Russian)]. doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-4-34-42.
9. Barth R.F., Zhang Z., Liu T. A realistic appraisal of boron neutron capture therapy as a cancer treatment modality. Cancer Commun (Lond). 2018 Jun 19; 38(1): 36. doi: 10.1186/s40880-018-0280-5.
10. World Health Organization. Cancer; 2018 [Internet]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (cited 12.09.2018).
11. Coderre J.A., Chanana A.D., Joel D.D., Elowitz E.H., Micca P.L., Nawrocky M.M., Chadha M., Gebbers J.O., Shady M., Peress N.S., Slatkin D.N. Biodistribution of boronophenylalanine in patients with glioblastoma multiforme: boron concentration correlates with tumor cellularity. Radiat Res. 1998 Feb; 149(2): 163–70.
12. Zavyalov E., Zaboronok A., Kanygin V., Kasatova A., Kichigin A., Mukhamadiyarov R., Razumov I., Sycheva T., Mathis B.J., Maezono S.E.B., Matsumura A., Taskaev S. Accelerator-based boron neutron capture therapy for malignant glioma: a pilot neutron irradiation study using boron phenylalanine, sodium borocaptate and liposomal borocaptate with a heterotopic U87 glioblastoma model in SCID mice. Int J Radiat Biol. 2020 Jul; 96(7): 868–878. doi: 10.1080/09553002.2020.1761039.
13. Иванов А.А., Касатов Д.А., Кошкарев А.М., Макаров А.Н., Остреин Ю.М., Сорокин И.Н., Таскаев С.Ю., Щудло И.М. Получение протонного пучка с током 5 мА в ускорителе-тандеме с вакуумной изоляцией. Письма в Журнал технической физики. 2016; 42(12): 1–8. [Ivanov A.A., Kasatov D.A., Koshkarev A.M., Makarov A.N., Ostreinov Yu.M., Sorokin I.N., Taskaev S.Yu., Shchudlo I.M. Obtaining a Proton Beam with 5-mA Current in a Tandem Accelerator with Vacuum Insulation. Technical Physics Letters, 2016; 42(12): 1–8. (in Russian)]. doi: 10.1134/S1063785016060225.
14. Таскаев С.Ю. Ускорительный источник эпителиальных нейтронов. Физика элементарных частиц и атомного ядра. 2015; 46(6): 1770–1830. [Taskaev S.Yu. Accelerator based epithelial neutron source. Physics of Elementary Particles and Atomic Nucleus. 2015; 46(6): 1770–1830. (in Russian)]. doi: 10.1134/S1063779615060064.
15. Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc. 2006; 1(5): 2315–9. doi: 10.1038/nprot.2006.339.
16. Каныгин В.В., Завьялов Е.Л., Симонович А.Е., Касатова А.И., Кичигин А.И., Разумов И.А., Таскаев С.Ю. Бор-нейтронзахватная терапия глиобластомы человека на моделях опухоли *in vivo*. Современные проблемы науки и образования. 2019; 1: 16. [Kanygin V.V., Zavyalov E.L., Simonovich A.E., Kasatova A.I., Kichigin A.I., Razumov I.A., Taskaev S. Boron neutron capture therapy of human glioblastoma on *in vivo* tumour models. Modern Problems of Science and Education. 2019; 1: 16. (in Russian)].
17. Maruyama K., Ishida O., Kasaoka S., Takizawa T., Utoguchi N., Shinohara A., Chiba M., Kobayashi H., Eriguchi M., Yanagie H. Intracellular targeting of sodium mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) to solid tumors by transferrin-PEG liposomes, for boron neutron-capture therapy (BNCT). J Control Release. 2004 Aug 11; 98(2): 195–207. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.04.018.
18. Honkanen J., Rantanen V., Kulmala J., Grénman R., Klemi P., Pekkola K. Radiosensitivity of dermal and tumor fibroblasts derived from the same patient. J Cancer Res Clin Oncol. 1998; 124(8): 415–20. doi: 10.1007/s004320050193.
19. Menichetti L., Gaetano L., Zampolli A., Del Turco S., Ferrari C., Bortolussi S., Stella S., Altieri S., Salvadori P.A., Cionini L. *In vitro* neutron irradiation of glioma and endothelial cultured cells. Appl Radiat Isot. 2009 Jul; 67(7–8 Suppl): S336–40. doi: 10.1016/j.apradiso.2009.03.058.
20. Rossini A.E., Dagrosa M.A., Portu A., Saint Martin G., Thorp S., Casal M., Navarro A., Juvenal G.J., Pisarev M.A. Assessment of biological effectiveness of boron neutron capture therapy in primary and metastatic melanoma cell lines. Int J Radiat Biol. 2015 Jan; 91(1): 81–9. doi: 10.3109/09553002.2014.942013.
21. Carpano M., Perona M., Rodriguez C., Nievas S., Olivera M., Santa Cruz G.A., Brandizzi D., Cabrini R., Pisarev M., Juvenal G.J., Dagrosa M.A. Experimental Studies of Boronophenylalanine (( $^{10}\text{B}$ )BPA) Biodistribution for the Individual Application of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for Malignant Melanoma Treatment. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2015 Oct 1; 93(2): 344–52. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.05.039.
22. Kulmala J., Rantanen V., Pekkola-Heino K., Tuominen J., Grénman R. Dosimetry of irradiation models. The 96-well clonogenic assay for testing radiosensitivity of cell lines. Acta Oncol. 1995; 34(1): 105–9. doi: 10.3109/028418695509093647.
23. Doi A., Kawabata S., Iida K., Yokoyama K., Kajimoto Y., Kuroiwa T., Shirakawa T., Kirihata M., Kasaoka S., Maruyama K., Kumada H., Sakurai Y., Masunaga S., Ono K., Miyatake S. Tumor-specific targeting of sodium borocaptate (BSH) to malignant glioma by transferrin-PEG liposomes: a modality for boron neutron capture therapy. J Neurooncol. 2008 May; 87(3): 287–94. doi: 10.1007/s11060-008-9522-8.
24. Kanygin V., Zaboronok A., Taskaeva I., Zavyalov E., Mukhamadiyarov R., Kichigin A., Kasatova A., Razumov I., Sibirtsev R., Mathis B.J. *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of Fluorescently Labeled Borocaptate-Containing Liposomes. J Fluoresc. 2021 Jan; 31(1): 73–83. doi: 10.1007/s10895-020-02637-5.
25. Беленко А.А., Васильев С.А., Лебедев И.Н. Маркеры индивидуальной радиочувствительности экстраэмбриональных клеток зародышей человека в условиях *in vitro*. Экологическая генетика. 2015; 13(4): 34–36. [Belenko A.A., Vasilyev S.A., Lebedev I.N. Markers of human extraembryonal cells individual radiosensitivity *in vitro*. Ecological genetic. 2015; 13(4): 34–36. (in Russian)].

Поступила/Received 21.07.2020  
Принята в печать/Accepted 15.10.2020

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Каныгин Владимир Владимирович**, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией МБП БНЗТ, Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск, Россия). E-mail: kanigin@mail.ru. SPIN-код: 4211-2417. Author ID (Scopus): 54408472800. ORCID: 0000-0002-9220-8663.

**Касатова Анна Исмагиловна**, младший научный сотрудник, Институт ядерной физики СО РАН; младший научный сотрудник лаборатории МБП БНЗТ, Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск, Россия). E-mail: yarullinaai@yahoo.com. SPIN-код: 4452-1477. Author ID (Scopus): 54408472800. ORCID: 0000-0002-6641-9344.

**Разумов Иван Алексеевич**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики лабораторных животных, Институт цитологии и генетики СО РАН; старший научный сотрудник лаборатории МБП БНЗТ, Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 6537-9019. Researcher ID (WOS): X-1783-2019. Author ID (Scopus): 7003465369. ORCID: 0000-0002-6756-1457.

**Завьялов Евгений Леонидович**, кандидат биологических наук, заведующий ЦКП «SPF»-виварий, старший научный сотрудник лаборатории МБП БНЗТ, Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 5251-0923. Researcher ID (WOS): X-2415-2019. Author ID (Scopus): 26321256500. ORCID: 0000-0002-9412-3874.

**Кичигин Александр Иванович**, младший научный сотрудник лаборатории МБП БНЗТ, Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 4321-2422. Researcher ID (WOS): N-7302-2017. Author ID (Scopus): 57189322552. ORCID: 0000-0001-8763-2905.

**Мухамадияров Ринат Авхадьевич**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; научный сотрудник лаборатории, МБП БНЗТ, Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 87474. Researcher ID (WOS): H-7668-2017. Author ID (Scopus): 56532504300. ORCID: 0000-0002-5558-3229.

**Таскаев Сергей Юрьевич**, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, Институт ядерной физики СО РАН, заведующий лабораторией БНЗТ, Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 7717-9560. Researcher ID (WOS): D-8479-2016. ORCID: 0000-0002-5313-2563.

ВКЛАД АВТОРОВ

**Каныгин Владимир Владимирович**: концепция и дизайн исследования.

**Касатова Анна Исмагиловна**: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написания текста.

**Разумов Иван Алексеевич**: сбор и обработка материала.

**Завьялов Евгений Леонидович**: статистическая обработка.

**Кичигин Александр Иванович**: концепция и дизайн исследования.

**Мухамадияров Ринат Авхадьевич**: сбор и обработка материала, написание текста.

**Таскаев Сергей Юрьевич**: сбор и обработка материала.

**Финансирование**

*Исследование проведено при поддержке гранта РФФ № 19-72-30005 (облучение клеток потоком нейтронов) и гранта РФФИ № 18-29-01007 (закупка сред и расходных материалов для in vitro исследований, получение липосом) с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).*

**Конфликт интересов**

*Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.*

**Благодарности**

*Авторы выражают благодарность А.Н. Макарову, Д.А. Касатову, И.М. Щудло, Я.А. Колесникову, Е.О. Соколовой, А.М. Кошкареву, Т.А. Быкову за обеспечение генерации нейтронов, Т.В. Сычевой за проведение расчетов поглощенной дозы.*

ABOUT THE AUTHORS

**Vladimir V. Kanygin**, MD, PhD, Assistant Professor, Head of Medical Biological Laboratory, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia). E-mail: kanigin@mail.ru. Author ID (Scopus): 54408472800. ORCID: 0000-0002-9220-8663.

**Anna I. Kasatova**, Junior Researcher, Medical Biological Laboratory, Institute of Nuclear Physics, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 54408472800. ORCID: 0000-0002-6641-9344.

**Ivan A. Razumov**, DSc, Senior Researcher, Laboratory of Genetics of Laboratory Animals, Institute of Cytology and Genetics; Senior Researcher, Medical Biological Laboratory, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): X-1783-2019. Author ID (Scopus): 7003465369. ORCID: 0000-0002-6756-1457.

**Evgeny L. Zavyalov**, PhD, Senior Researcher, Medical Biological Laboratory, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): X-2415-2019. Author ID (Scopus): 26321256500. ORCID: 0000-0002-9412-3874.

**Alexandr I. Kichigin**, Junior Researcher, Medical Biological Laboratory, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): N-7302-2017. Author ID (Scopus): 57189322552. ORCID: 0000-0001-8763-2905.

**Rinat A. Mukhamadiyarov**, PhD, Senior Researcher, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases (Kemerovo, Russia); Researcher, Medical Biological Laboratory, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): H-7668-2017. Author ID (Scopus): 56532504300. ORCID: 0000-0002-5558-3229.

**Sergey Yu. Taskaev**, DSc, Leading Researcher, Institute of Nuclear Physics, Head of Medical Biological Laboratory, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): D-8479-2016. ORCID: 0000-0002-5313-2563.

#### AUTHOR CONTRIBUTION

**Vladimir V. Kanygin**: concept and design of the study.

**Anna I. Kasatova**: concept and design of the study, data collection and analysis, statistical data analysis, writing of the manuscript.

**Ivan A. Razumov**: data collection and analysis.

**Evgeny L. Zavyalov**: statistical data analysis.

**Alexandr I. Kichigin**: concept and design of the study.

**Rinat A. Mukhamadiyarov**: data collection and analysis, writing of the manuscript.

**Sergey Yu. Taskaev**: data collection and analysis.

#### **Funding**

*The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation project № 19-72-30005 (irradiation of cell cultures with a neutron flux) and Russian Foundation for Basic Research grant № 18-29-01007 (purchase of medium and supplies for in vitro studies, production of liposomes) using the equipment of the Center for Genetic Resources of Laboratory Animals, Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, supported by the Ministry of Education and Science of Russia (Unique identifier of the project is RFMEFI62117X0015).*

#### **Conflict of interest**

*The authors declare that they have no conflict of interest.*

#### **Acknowledgment**

*We thank A.N. Makarov, I.M. Schudlo, D.A. Kasatov, Ya.A. Kolesnikov, E.O. Sokolova, A.M. Koshkarev, and T.A. Bykov, for generation of neutrons, T.V. Sycheva for calculations of absorbed dose.*