

ИЗУЧЕНИЕ СИНЕРГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 1- β -D-АРАБИНОФУРАНОЗИЛЦИТОЗИНА И РАДИОНУКЛИДНОЙ ТЕРАПИИ МЕТИЛЕНОВЫМ СИНИМ, МЕЧЕННЫМ ЙОДОМ-131, НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ ЛИНИИ В16F10

Е. А. Красавин^а, А. С. Лунёв,^{б, 1} К. А. Петросова^б,
А. Б. Брускин^б, А. Е. Захаркина^б, А. В. Борейко^а, А. Н. Бугай^а

^а Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, 141980, Россия

^б ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна
ФМБА России, Москва, Россия

Целью исследования является изучение методов повышения чувствительности злокачественных опухолей к лучевой терапии с использованием метиленового синего, меченого йодом-131, в сочетании с ингибиторами репарации повреждений ДНК. Исследования показали, что метиленовый синий, меченный йодом-131 (с/без АраЦ), быстро проникает в клетки и около 70% усваивается в течение 3 ч. Период полувыведения снижается до 3,5 сут. С помощью моделирования Geant4 были рассчитаны поглощенные дозы, показавшие, что комбинация метиленовый синий, меченный йодом-131, + АраЦ имела относительную биологическую эффективность, равную 5,13. Наши результаты свидетельствуют, что в присутствии АраЦ доля выживших облученных клеток меланомы В16F10, обработанных метиленовым синим, меченым йодом-131, значительно снижается. Этот эффект можно объяснить снижением пролиферации клеток в общей популяции, а также снижением количества опухолевых стволовых клеток, особенно в группе АраЦ + йод-131. Полученные результаты позволяют рассматривать комбинированную терапию как перспективный подход для повышения эффективности радионуклидной терапии.

The study is aimed at investigating methods for sensitizing malignant tumors to radiation therapy using [¹³¹I]-labeled methylene blue in combination with DNA damage repair inhibitors. Studies showed that [¹³¹I]-labeled methylene blue (with/without AraC) rapidly entered cells, with ~ 70% internalized within 3 h. Uptake decreased with a half-life of 3.5 days. Geant4 simulations calculated absorbed doses, revealing that the [¹³¹I]-labeled methylene blue + AraC pair had an RBE of 5.13. Our findings indicate that in the presence of AraC, the survival fraction of irradiated B16F10 melanoma cells treated with iodine-131 is significantly reduced. This effect can be attributed to a decrease in cell proliferation in the overall population, as well as a reduction in the number of cancer stem cells specifically in the “AraC + iodine-131” group. These results hold promise for enhancing the efficacy of radionuclide therapy in the future.

PACS: 87.53.Jw

¹E-mail: mr.alekslunev@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия широкое распространение получают высокотехнологичные методы радионуклидной терапии онкологических заболеваний с использованием радиофармпрепаратов. Радионуклидная терапия обладает рядом существенных преимуществ в лечении рака, в первую очередь благодаря своей способности целенаправленно доставлять излучение непосредственно к опухолевым клеткам, минимизируя при этом повреждение окружающих здоровых тканей [1]. Такая точность достигается за счет использования радиофармпрепаратов, которые специфически связываются с маркерами опухолевых клеток, такими как рецепторы или антигены, что позволяет проводить таргетное воздействие. Кроме того, этот подход является минимально инвазивным и обычно осуществляется с помощью внутривенной инъекции, что позволяет избежать необходимости хирургического вмешательства или внешнего облучения [2]. Однако радионуклидная терапия также сталкивается с рядом проблем [3]. Одним из основных недостатков является риск неспецифической токсичности, поскольку некоторые радионуклиды могут накапливаться в здоровых органах, таких как почки или костный мозг, что приводит к неблагоприятным последствиям. Ограниченная глубина проникновения определенных типов излучения (например, альфа- или бета-частиц) также может снижать эффективность при опухолях большого размера или со слабой васкуляризацией. Резистентность опухоли, обусловленная генетической гетерогенностью или подавлением регуляции молекул-мишеней, еще больше осложняет результаты лечения [4].

Несмотря на эти ограничения, продолжающиеся исследования новых медицинских радионуклидов, усовершенствованных систем доставки и комбинированных методов лечения обещают повысить эффективность и доступность этого инновационного подхода к лечению. Одним из таких направлений является использование терапевтических радиофармпрепаратов в комбинации с ингибиторами репарации повреждений и синтеза ДНК [5, 6]. Репарация поврежденной ДНК является важным процессом в реакции клеток на воздействие ионизирующего излучения. Поэтому, с одной стороны, определенные ингибиторы репарации успешно используются в лучевой терапии в течение десятилетий в качестве радиосенсибилизаторов [7, 8]. С другой стороны, использование ингибиторов репарации и/или синтеза ДНК в сочетании с радионуклидной терапией представляет собой многообещающий путь для разработки новых методов лечения. Среди ингибиторов репарации повреждений и синтеза ДНК, индуцированных ионизирующим излучением, особый интерес представляет 1-β-D-арабинофуранозилцитозин (АраЦ).

Как известно, радиационная гибель клеток в значительной степени обусловлена образованием в их ДНК двунитевых разрывов (ДР ДНК). Среди широкого спектра различных радиационно-индуцированных повреждений ДНК такие молекулярные нарушения являются наиболее серьезными. Они образуются либо в результате прямого разрыва двух комплементарных областей, обусловленного передачей энергии локальному участку ДНК и приводящего к нарушению ее целостности, — прямые ДР ДНК, либо из-за других повреждений как «издержки репарации» в процессе работы репарационных ферментов. Этот тип повреждений относится к категории энзиматических ДР (ЭДР). Поскольку выход ДР ДНК во время облучения зависит от ряда биологических факторов, на частоту их образования можно влиять, модифицируя процессы

репарации и/или синтеза ДНК. Ранее в лаборатории Е. А. Красавина было изучено модифицирующее влияние АраЦ на чувствительность нормальных и опухолевых клеток при действии ионизирующих излучений с различными физическими характеристиками [9–11]. Было обнаружено, что при действии γ -облучения и высокоэнергетичных протонов в условиях влияния АраЦ увеличивается выход прямых ДР ДНК, что приводит к повышению радиочувствительности клеток. В то же время при действии ускоренных тяжелых ионов модифицирующий эффект агента был значительно снижен. Механизм усиливающего действия АраЦ на радиочувствительность клеток основан на процессах, модифицирующих репарацию повреждений ДНК и приводящих к образованию летальных повреждений. АраЦ является эффективным ингибитором ДНК-полимеразы α и, в меньшей степени, β , которые отвечают за репаративный синтез ДНК [12, 13]. При длительной фиксации нерепарируемых прямых односторонних разрывов ДНК, формирующихся в ходе эксцизионной репарации модифицированных оснований, такие изменения в структуре ДНК могут служить сайтами формирования ЭДР в результате атаки нити, оппозитной поврежденному сайту, S1-эндонуклеазами. Это приводит к увеличению общего выхода ДР ДНК при действии излучений с низкой линейной передачей энергии [14, 15].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез и анализ радиохимической чистоты метиленового синего, меченного йодом-131 (^{131}I –МВ). Радиоактивное сырье (йодид натрия-131 без носителя, в 0,3 мл 0,02-М раствора гидроксида натрия), 0,1 мл 2%-го раствора метиленового синего, 0,2 мл 0,005-М раствора йодида калия и 0,5 мл 0,5-М раствора соляной кислоты последовательно вводили в реакционный сосуд, затем нагревали при температуре 105–110 °С в течение 45 мин. Схема синтеза представлена на рис. 1. Пробу радиофармпрепарата отбирали после охлаждения на воздухе и анализировали методами ТСХ и ВЭЖХ. Анализ методом ТСХ проводили на планшетах Silufol или ITLC-SG, элюируя изотоническим раствором хлорида натрия. Метиленовый синий с радиоактивной меткой остается в начале Rf 0,05, йод-131 перемещается в начало Rf 0,9. Полоску заклеивали скотчем с обеих сторон и анализировали с помощью сканера MiniGita (Ray test, Германия). Радиохимическую чистоту рассчитывали как отношение активности исходного участка к активности всей полоски. Анализ методом ВЭЖХ проводили на хроматографе SmartLine (Knauer, Германия) с последовательно

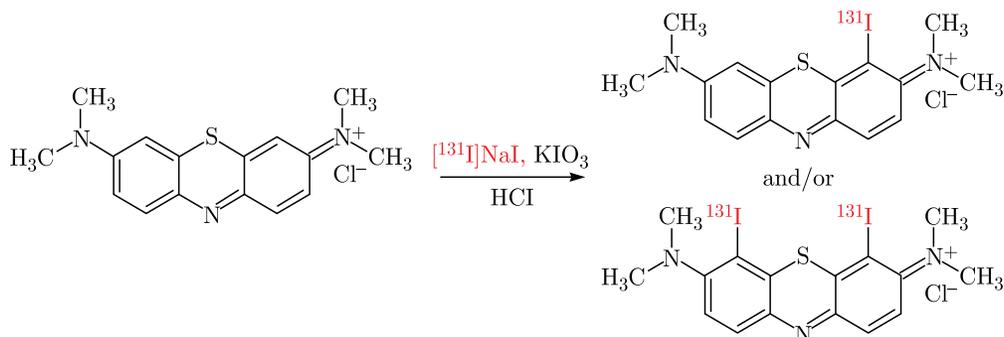


Рис. 1. Синтез метиленового синего, меченного йодом-131

подключенными детекторами ультрафиолетового излучения (260 нм) и радиоактивности (BERTHOLD HERMLE LB 500). Элюент — ацетонитрил – вода – 0,05%-я трифторуксусная кислота, колонка из монолитного кремнезема Chromolith RP-18 (Merck), программное обеспечение Chromeleon.

In vitro исследования накопления метиленового синего, меченного йодом-131. Клеточная линия V16F10 — это надежная и универсальная тест-система для изучения агрессивных форм меланомы и метастатических процессов, которая обеспечивает высокую стандартизацию исследований и воспроизводимость данных. Культивирование проводили во флаконах с площадью поверхности роста клеток 25 см². В состав полной питательной среды для выращивания входила питательная среда DMEM (модифицированная Eagle Medium от Dulbecco) с добавлением фетальной бычьей сыворотки (FBS) в конечной концентрации 10% и 1% антибиотика пенициллина/стрептомицина. Флаконы с клетками инкубировали при температуре 37 °С в атмосфере 6% CO₂. Пассирование проводили при достижении 80–90%-й конфлюэнтности с использованием 0,25%-го раствора трипсина-ЭДТА. Время удвоения находится в пределах от 17,2 до 20,1 ч. Кратность посева в новые флаконы составляла 1:3. По достижении необходимого количества клеток в монослое флакона клетки помещали в 12-луночные планшеты для экспериментов *in vitro*. Общее поглощение клетками и интернализацию клеток рассчитывали для раствора йодида натрия-131 (49,8 МБк/мл) и меченного йодом-131 метиленового синего (50,2 МБк/мл, 62,5 ммоль/л метиленового синего) без и с предварительным добавлением АраЦ (4 нмоль/л, за 1 ч до этого). Клетки меланомы V16F10 высевали в трех повторностях на 12-луночные планшеты в полной питательной среде. После образования монослоя клеток в лунки добавляли раствор йодида натрия-131 и меченный йодом-131 метиленовый синий без предварительного добавления и с предварительным добавлением АраЦ (100 мкл) (инкубация при температуре 37 °С в течение 1, 3 и 24 ч). Затем среду удаляли, клетки дважды промывали раствором Хэнкса, а надосадочную жидкость переносили в пробирки для анализа. После удаления несвязанной радиоактивности в лунки с клетками добавляли 1 мл охлажденного буферного раствора глицина (в 0,1-М растворе хлорида натрия с рН 2,8). Затем клетки инкубировали в течение 5 мин при пониженной температуре. После удаления буферного раствора в лунки с клетками добавляли по 1 мл диссоциирующего 0,25%-го раствора трипсина-ЭДТА. Клетки, отделенные от поверхности лунок, также переносили в необходимые пробирки для измерения радиоактивности. Радиоактивность образцов измеряли с помощью прямой радиометрии на автоматическом гамма-счетчике Wizard 2480 (PerkinElmer, США).

Расчет поглощенных доз. Вклад γ-излучения йода-131 в общую поглощенную дозу не учитывался, поскольку размеры лунок культуральных планшетов, клеточного слоя и самих клеток во много раз меньше длины волны γ-излучения, в дополнение к низкой ЛПЭ (линейной передаче энергии). Поглощенные дозы $D(t)$, генерируемые в течение времени t в клеточном слое и клетках, были рассчитаны по формуле

$$D(t) = N(t) DF,$$

где $N(t)$ — общее количество распадов за время t в зоне источника йода-131, Бк · с; DF — фактор дозы, отражающий поглощенную энергию на единицу массы целевой зоны за один распад йода-131 в зоне источника, Гр · Бк⁻¹ · с⁻¹. Фактор дозы может

быть рассчитан по формуле

$$DF = k \frac{\Delta E \varphi}{\rho V},$$

где k — коэффициент пересчета единиц измерения, $1,6 \cdot 10^{-13}$ Гр·г·кэВ $^{-1}$; ΔE — средняя энергия β -частиц (192,35 кэВ для йода-131); ρ — плотность областей в эксперименте, принятая за плотность воды, $1 \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$; V — объем области-мишени, мл; φ — поглощенная фракция, отражающая долю поглощенной энергии в области-мишени на один распад йода-131 из области-источника. Поглощенная фракция зависит от геометрии области-мишени и области-источника излучения, от расстояния между мишенью и источником, а также от ядерно-физических характеристик радионуклида.

Для расчета поглощенных фракций методом Монте-Карло использовался пакет библиотек Geant4 [16]. Программный код Geant4 разработан в ЦЕРН для моделирования прохождения частиц через вещество. При моделировании поглощенных доз распад исходного радионуклида и все процессы взаимодействия испускаемых электронов с веществом моделировали в предположении равномерного распределения радионуклида по объему. Для достижения требуемой статистической точности для каждого варианта было смоделировано 10^8 историй (распадов). Был использован набор физических процессов PENELOPE (physics list), поскольку он более точно описывает взаимодействия электронов с низкой энергией [17]. Для написания кода проекта за основу был взят пример RE03, так как он хорошо демонстрирует работу класса ScoringManager, который удобен для расчета дозы. Поскольку эксперимент включал нанесение слоя радиоактивного йода-131 на монослой клеток, растущих в лунках 12-луночного планшета, геометрия модели была реализована с использованием библиотеки G4Tubs. Каждая лунка состояла из двух цилиндров А и В, равномерно заполненных опухолевыми клетками и культуральной средой соответственно (рис. 2). Диаметр лунки и толщина слоев культуральной среды и клеток были взяты из реального эксперимента: диаметр цилиндров составлял 22 мм, а толщина слоя культуральной среды (цилиндр В) и толщина слоя клеток (цилиндр А) составляли 2630 и 25 мкм соответственно. В качестве материала для слоев была выбрана вода (G4_WATER), близкая по параметрам живым клеткам. Экспериментальная модель была расположена в кубическом объеме размером $2 \times 2 \times 2$ м, заполненном воздухом. Для реализации распада ядер йода-131 был подключен набор библиотек физических процессов QGSP_BIC_HP. Генерация случайных процессов для численного эксперимента была реализована с помощью G4Random. Для того чтобы задать источник

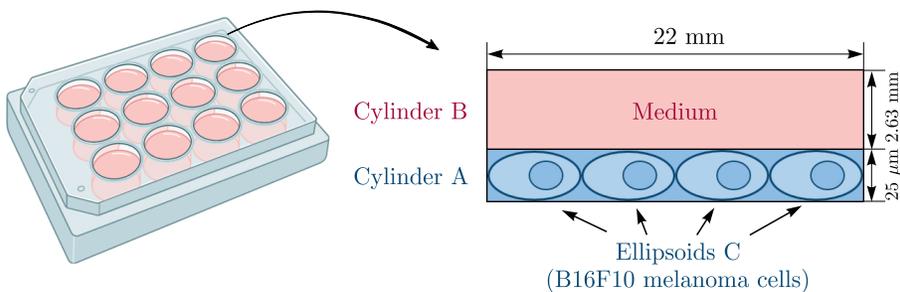


Рис. 2. Схема геометрических форм для расчета поглощенных доз

излучения, использовался класс G4GeneralParticleSource. Для работы счетчика были написаны макросы для расчета поглощенной дозы излучения от йода-131 в разных слоях — цилиндрах А и В. Данные были выведены в файлы формата CSV. Для расчета доли собственной дозы на одну клетку в Geant4 были реализованы цилиндрические, сферические и эллипсоидальные модели определенного размера с учетом распределения йода-131 на поверхности клетки и в цитоплазме. Полученные результаты позволят нам понять, какую радиоактивность йода-131 необходимо добавить в лунки с клетками для получения определенной поглощенной дозы (1, 2, 4 и 6 Гр) за определенный период времени (7 сут).

Клоногенный анализ. Опухолевые клетки меланомы В16F10 предварительно высеивали на 12-луночные культуральные планшеты в полную ростовую среду. По достижении монослоя (конфлюэнтность $\geq 80\%$, концентрация клеток $\sim 0,9 \cdot 10^6$) в часть лунок за 1 ч до внесения исследуемых радиоактивных соединений в пробы было добавлено по 100 мкл АраЦ (20 мкМ/проба). По истечении 1 ч к клеткам в лунки добавляли исследуемые соединения $\text{Na}^{[131]\text{I}}\text{I}$ и $^{[131]\text{I}}\text{I}$ – метиленовый синий в объеме 100 мкл с разной степенью разбавления, так чтобы его поглощенная доза варьировалась, согласно схеме эксперимента. Далее клетки инкубировались в течение 3 ч, после чего среду удаляли, промывали лунки с монослоем 1 мл раствора Версена и снимали клетки с поверхности лунок 0,25%-м раствором трипсина-ЭДТА. Полученная взвесь клеток рассеивалась на 25-см² культуральные флаконы (из расчета 2000 клеток на флакон) по три параллельных образца в среде DMEM с фетальной сывороткой в конечной концентрации 10% и последующей инкубацией в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и 5% CO₂. Через 7 сут, необходимых для образования колоний, среду удаляли, клетки однократно промывали 2 мл раствора Хэнкса, затем сформировавшиеся колонии фиксировали и одновременно прокрашивали при помощи 0,3%-го раствора кристаллического фиолетового в этаноле (1 мл на 25-см² флакон) в течение не менее 5 мин при комнатной температуре. Затем клетки тщательно промывали водой до исчезновения фонового окрашивания стенок флакона, затрудняющего счет колоний. Количество колоний в каждом флаконе определяли путем компьютерной обработки фотографий колоний.

Статистический анализ. Для статистического анализа данных использовался непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни. Этот метод был выбран из-за небольшого размера выборки, что не позволило нам проверить нормальность распределения. Анализ проводился с использованием языка программирования Python и библиотеки SciPy. Для расчета тестовой статистики использовалась функция Манна–Уитни с аргументом *alternative* = «двусторонняя». Это позволило нам сравнить две независимые группы и проверить гипотезу о том, что медианы двух распределений равны.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Анализ данных, представленных на рис. 3, показал, что нет статистически значимой разницы в поглощении клетками метиленового синего, меченного йодом-131, без предварительного добавления АраЦ и с предварительным добавлением АраЦ.

Можно сделать вывод, что процессы накопления, интернализации и экстернализации этих метаболитов не являются конкурентными друг другу. После добавления $^{[131]\text{I}}\text{I}$ -МВ без АраЦ и с ним радиоактивно меченные молекулы быстро мигрировали

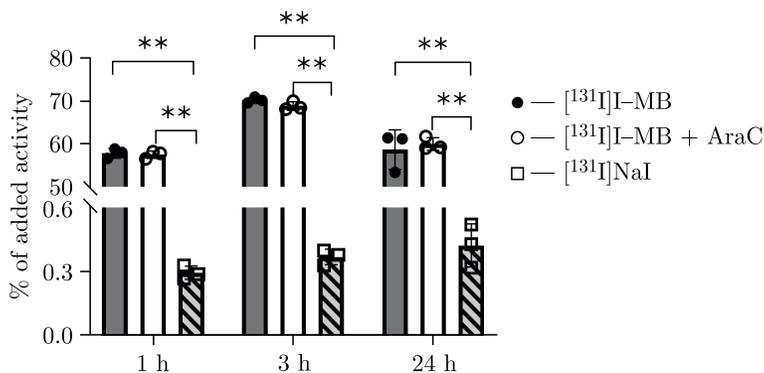


Рис. 3. Гистограмма поглощения клетками исследуемых соединений: [¹³¹I]I-MB — метиленовый синий, меченный йодом-131; AraC — 1-β-D-арабинофуранозилцитозин. Звездочками обозначены значимые различия ($p < 0,01$)

в клетки: в течение 1 ч после добавления почти 60% радиоактивности связывалось с клетками меланомы V16F10, более половины из которых интернализировалось, достигая максимального накопления к третьему часу. Через 24 ч уровень общего накопления снижался. Экстраполяция полученных кинетических данных позволила рассчитать, что период полувыведения метиленового синего с йодом-131 из клеток составляет $0,198 \text{ сут}^{-1}$ при физическом периоде полураспада $0,086 \text{ сут}^{-1}$. Интегрированный по времени коэффициент активности составил 84,4 ч. Напротив, йодид натрия-131 практически не накапливался в клетках и не проникал в клетки меланомы.

Дозиметрические характеристики были рассчитаны с использованием результатов экспериментов *in silico* и *in vitro* (табл. 1).

Анализ данных *in silico* показал, что вклад радиоактивности среды культивирования в облучение монослоя клеток составляет всего 0,5%, в то время как доля поглощенного собственного излучения клеточного слоя составляет 12,1%. Очевидно, что наибольшее значение фактора дозы DF было рассчитано для одиночных клеток. Рассчитанные дозовые коэффициенты были использованы для прогнозирования необходимого количества распадов и дополнительной радиоактивности йода-131, представленных в табл. 2, для получения необходимых поглощенных доз (1, 2, 4 и 6 Гр).

Для формирования поглощенных доз в 1, 2, 4 и 6 Гр от [¹³¹I]I-MB в течение 7 сут необходимо добавить 50, 100, 200 и 300 кБк на лунку соответственно. Аналогичная добавленная активность раствора йодида натрия-131 на лунку приводит к получению

Таблица 1. Дозиметрические характеристики (для йода-131) для геометрических форм, представленных на рис. 2

Параметр	A ← B*	A ← A**	C ← C***
Поглощенная фракция φ	0,005	0,121	0,013
Фактор дозы DF, Гр · Бк ⁻¹ · с ⁻¹	$1,62 \cdot 10^{-11}$	$3,91 \cdot 10^{-10}$	$9,63 \cdot 10^{-5}$

Таблица 2. Поглощенные дозы от йода-131 в клетках меланомы линии В16F10

Препарат	Добавленная активность йода-131, кБк · лунка ⁻¹	Число распадов, Бк · с				Поглощенная доза, Гр			
		В течение первых 3 ч		После 3-го ч		А ← В, t ∈ [0; 3]	А ← А, t ∈ [0; 3]	С ← С, t ∈ [3; 168]	Общая
		Слой А	Слой В	Внутри клетки	Внутри клетки				
¹³¹ I]I-MB	50	3,71 · 10 ⁸	1,61 · 10 ⁸	371,4	9126,7	0,003	0,145	0,879	1,027
	100	7,43 · 10 ⁸	3,22 · 10 ⁸	742,7	18253,4	0,005	0,290	1,758	2,053
	200	1,49 · 10 ⁹	6,45 · 10 ⁸	1485,4	36506,8	0,010	0,581	3,516	4,107
	300	2,23 · 10 ⁹	9,67 · 10 ⁸	2228,2	54760,2	0,016	0,871	5,273	6,160
¹³¹ I]NaI	50	1,55 · 10 ⁶	5,35 · 10 ⁸	1,6	18,9	0,009	0,001	0,002	0,011
	100	3,11 · 10 ⁶	1,07 · 10 ⁹	3,1	37,8	0,017	0,001	0,004	0,022
	200	6,21 · 10 ⁶	2,14 · 10 ⁹	6,2	75,5	0,035	0,002	0,007	0,044
	300	9,32 · 10 ⁶	3,21 · 10 ⁹	9,3	113,3	0,052	0,004	0,011	0,067

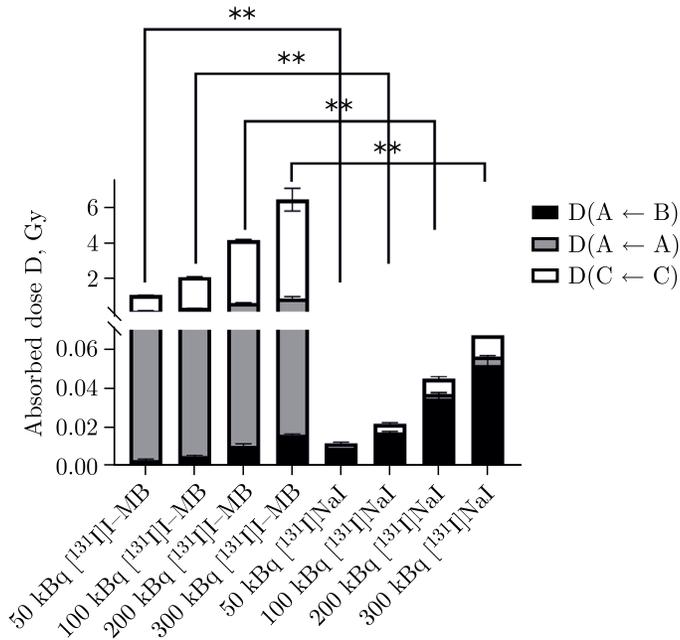


Рис. 4. Поглощенные дозы в клетках меланомы V16F10: $D(A \leftarrow B)$ — доза, поступающая в клетки слоя А из-за распада йода-131 в среднем слое В; $D(A \leftarrow A)$ — доза, поступающая в клетки слоя А из-за распада йода-131 в клетках слоя А; $D(C \leftarrow C)$ — доза, поступающая в отдельную клетку С из клеток слоя А из йода-131, распадающегося в той же клетке С. Звездочками обозначены значимые различия ($p < 0,01$)

поглощенных доз в 92 раза меньше, чем дозы от [¹³¹I]-МВ. Это связано с поглощением клетками исследуемых соединений, поскольку йодид натрия-131 практически не накапливался в клетках и не проникал в клетки меланомы, в отличие от метиленового синего, меченного йодом-131 (см. рис. 3).

Следует отметить, что накопленная в каждой клетке активность метиленового синего, меченного йодом-131, вносит основной вклад в формирование поглощенной дозы в клетках, в то время как для йодида натрия-131 большая часть поглощенной энергии в клетке была сформирована слоем культуральной среды (рис. 4).

Клоногенность опухолевых клеток меланомы V16F10 оценивали при воздействии различных комбинаций радиоактивных соединений (контрольная группа, группы, содержащие только комбинацию йод-131 – метиленовый синий различной активности, группа, содержащая только АраЦ, группы, содержащие комбинацию йод-131 – метиленовый синий различной активности с АраЦ, группы, содержащие только [¹³¹I]NaI различной активности). Монохромные фотографии лунок с колониями клеток меланомы V16F10 через 7 сут после облучения различными добавками йодида натрия-131 и метиленового синего, меченного йодом-131, без добавления/с добавлением АраЦ показаны на рис. 5. Затем монохромные фотографии идентичных участков лунок были подвергнуты компьютерной обработке для подсчета количества колоний, сформировавшихся через 7 сут после добавления радиоактивности.

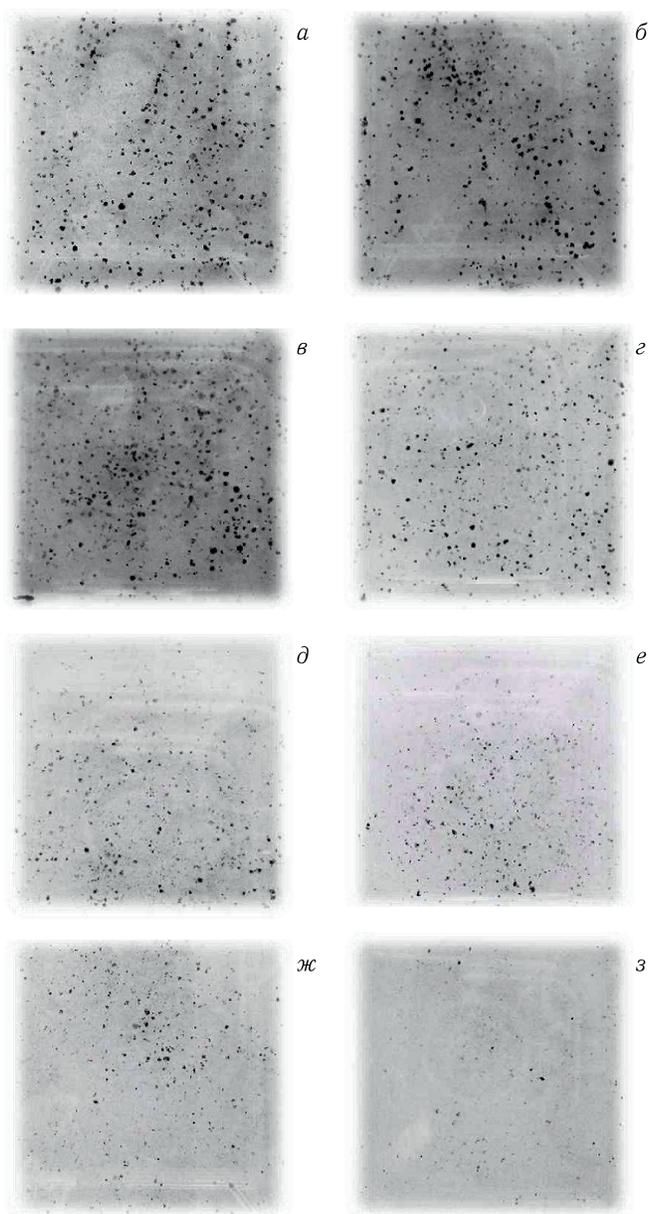


Рис. 5. Монохромные фотографии с колониями клеток меланомы В16F10 после 7 сут облучения: а) контроль; б) $[^{131}\text{I}]\text{NaI}$ (для 50, 100, 200, 300 кБк·мл $^{-1}$); в) $[^{131}\text{I}]\text{I-MB}$ (50 кБк·мл $^{-1}$); г) $[^{131}\text{I}]\text{I-MB}$ (100 кБк·мл $^{-1}$); д) $[^{131}\text{I}]\text{I-MB}$ (200 кБк·мл $^{-1}$); е) $[^{131}\text{I}]\text{I-MB}$ (300 кБк·мл $^{-1}$); ж) АраЦ; з) $[^{131}\text{I}]\text{I-MB}$ (50 кБк·мл $^{-1}$) + АраЦ

На рис. 5, б показана только одна монохромная фотография лунки с добавлением йодида натрия-131, поскольку количество колоний не изменялось при различной аналогичной активности метиленового синего, меченного йодом-131, из-за образования

в клетках пренебрежимо малых доз. Монохромная фотография пары метиленовый синий, меченный йодом-131, + АраЦ показана на рис. 5, з только для $50 \text{ кБк} \cdot \text{мл}^{-1}$, поскольку для других уровней активности количество колоний во всей лунке было единичным.

В контрольной группе наблюдалась высокая клоногенность клеток, что подтверждается значительным количеством колоний, формирующихся в отсутствие добавления радиоактивности. В группах, получавших только метиленовый синий, меченный йодом-131, наблюдалось умеренное снижение клоногенности по сравнению с контрольной группой. Снижение клоногенности также наблюдалось в группе, получавшей только АраЦ. Значительное снижение количества выживших и колониобразующих клеток наблюдалось в группах, где использовалась комбинация метиленового синего, меченного йодом-131, и АраЦ (рис. 6).

Анализ данных показывает, что различная добавленная активность йодида натрия-131 статистически значимо не снижала жизнеспособность клеток меланомы V16F10 по сравнению с контролем. Это согласуется с данными о накоплении и усвоении йодида натрия-131. Напротив, добавление $\text{кБк} \cdot \text{мл}^{-1}$ метиленового синего, меченного йодом-131, значительно уменьшало количество выжившей фракции, как и добавление раствора АраЦ. Как и ожидалось, увеличение добавленной радиоактивности еще больше снижало жизнеспособность клеток с достижением минимума при максимальной активности $300 \text{ кБк} \cdot \text{мл}^{-1}$ ($28,3 \pm 0,7$ % выживших клеток при использовании метиленового синего, меченного йодом-131, и только $(0,3 \pm 0,1)$ % выживших клеток в комбинации с АраЦ). Можно сделать вывод о синергическом действии 1- β -D-арабинофуранозилцитозина и радионуклидной терапии метиленовым синим, меченным йодом-131. Комбинированный эффект АраЦ и метиленового синего, меченного йодом-131 ($50 \text{ кБк} \cdot \text{мл}^{-1}$), был примерно в 3,8 и 1,8 раза выше, чем при использовании только метиленового синего, меченного йодом-131, или одного АраЦ соответственно. Синергический эффект $300 \text{ кБк} \cdot \text{мл}^{-1}$ метиленового синего, мечен-

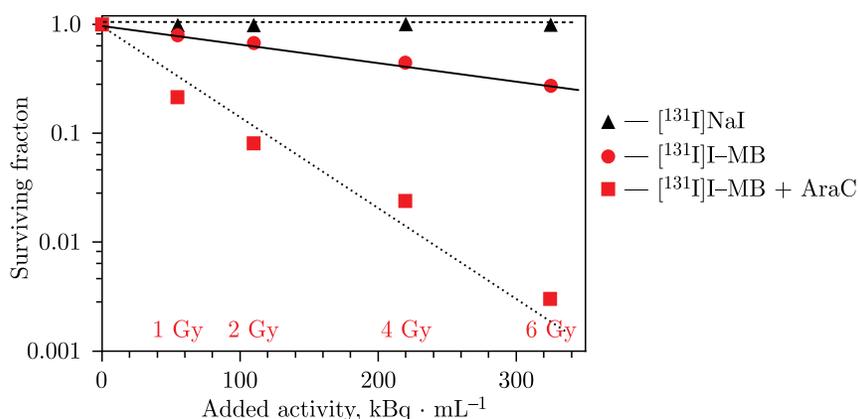


Рис. 6 (цветной в электронной версии). Зависимость выживающей фракции клеток меланомы V16F10 от добавленной активности йода-131. Красными символами отмечены метиленовый синий, меченный йодом-131, и полученные поглощенные дозы. Черными треугольниками обозначен йодид натрия-131

ного йодом-131, + АраЦ был примерно в 94,3 и 131 раз выше, чем при использовании только метиленового синего, меченного йодом-131, или одного АраЦ соответственно.

Зависимость выживающей фракции клеток меланомы В16F10 от генерируемых поглощенных доз описывалась дифференциальным уравнением $dS/dD = -aD$, где S — выживающая фракция, D — поглощенная доза, a — вероятность гибели клетки при облучении дозой 1 Гр. Таким образом, можно было рассчитать среднюю инактивирующую дозу (MID):

$$\text{MID} = \int_0^{\infty} S(D) dD = \frac{1}{a}.$$

Средняя инактивирующая доза для клеток меланомы В16F10, меченных йодом-131 — метиленовым синим, составила 4,77 Гр, в то время как средняя доза для комбинации меченного йодом-131 метиленового синего и АраЦ составила 0,93 Гр. Таким образом, ОБЭ составила 5,13. Иными словами, для достижения сопоставимого цитотоксического эффекта в комбинации с АраЦ требуется в 5,13 раза меньшая активность комбинации йод-131 — метиленовый синий по сравнению с монотерапией. Например, при добавлении 50 кБк метиленового синего, меченного йодом-131, количество погибших клеток будет таким же, как и при добавлении 9,75 кБк метиленового синего, меченного йодом-131, + АраЦ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования показали, что в отличие от йодида натрия [^{131}I]NaI меченный йодом-131 метиленовый синий без АраЦ и с АраЦ быстро мигрировал в клетки, более половины из которых были интернализированы (около 70% за 3 ч инкубирования). Общее всасывание снижалось с периодом полувыведения $0,198 \text{ сут}^{-1}$ (3,5 сут). Поглощенные фракции были рассчитаны с помощью компьютерного моделирования Geant4 и имитации эксперимента, проведенного на клетках. Это моделирование помогло понять, какую степень радиоактивности йода-131 следует добавлять в состав различных соединений для изучения выживаемости клеток меланомы В16F10 после их облучения. В результате было показано, что ОБЭ для пары метиленовый синий, меченный йодом-131, + АраЦ равна 5,13. Другими словами, чтобы вызвать гибель аналогичного количества клеток от меченного йодом-131 метиленового синего, необходимо добавить в комбинации с 1-β-D-арабинофуранозилцитозином в 5,13 раза меньше радиоактивности. Комбинация метиленового синего, меченного йодом-131, с АраЦ продемонстрировала значительное подавление клоногенности клеток меланомы В16F10 по сравнению с контрольными образцами и образцами, обработанными йодидом натрия-131. Таким образом, использование АраЦ в качестве ингибитора репарации ДНК в сочетании с облучением дает синергический эффект и может применяться в радионуклидной терапии для снижения активности радионуклидов в составе радиофармпрепаратов.

Финансирование. Работа профинансирована Объединенным институтом ядерных исследований в рамках договора между ОИЯИ и ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России.

Конфликт интересов. Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Asadian S., Mirzaei H., Kalantari B.A., Davarpanah M.R., Mohamadi M., Shpichka A., Nasehi L., Es H.A., Timashev P., Najimi M. et al.* β -Radiating Radionuclides in Cancer Treatment, Novel Insight into Promising Approach // *Pharmacol. Res.* 2020. V. 160. P. 105070.
2. *Yeong C.H., Cheng M.H., Ng K.H.* Therapeutic Radionuclides in Nuclear Medicine: Current and Future Prospects // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2014. V. 15. P. 845–863.
3. *Kleynhans J., Sathegke M., Ebenhan T.* Obstacles and Recommendations for Clinical Translation of Nanoparticle System-Based Targeted Alpha-Particle Therapy // *Materials.* 2021. V. 14. P. 4784.
4. *Lunger L., Tauber R., Feuerecker B., Gschwend J.E., Eiber M.* Narrative Review: Prostate-Specific Membrane Antigen-Radioligand Therapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer // *Transl. Androl. Urol.* 2021. V. 10. P. 3963–3971.
5. *Obata Honoka, Mikako Ogawa, Zalutsky M.R.* DNA Repair Inhibitors: Potential Targets and Partners for Targeted Radionuclide Therapy // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15, No. 7. P. 1926.
6. *Chan T.G. et al.* Combination Strategies to Improve Targeted Radionuclide Therapy // *J. Nucl. Med.* 2020. V. 61, No. 11. P. 1544–1552.
7. *Drew Y., Zenke F.T., Curtin N.J.* DNA Damage Response Inhibitors in Cancer Therapy: Lessons from the Past, Current Status and Future Implications // *Nature Rev. Drug Discovery.* 2025. V. 24, No. 1. P. 19–39.
8. *Cheng B. et al.* Recent Advances in DDR (DNA Damage Response) Inhibitors for Cancer Therapy // *Eur. J. Med. Chem.* 2022. V. 230. P. 114109.
9. *Boreyko A.V., Chausov V.N., Krasavin E.A., Ravnachka I., Stukova S.I.* The Influence of DNA Inhibitor Synthesis on the Induction and Repair of Double-Strand DNA Breaks in Human Lymphocytes under Action of Radiation with a Different Linear Energy Transfer // *Phys. Part. Nucl. Lett.* 2011. V. 8, No. 4(167). P. 670–678.
10. *Chausov V.N., Boreyko A.V., Bulanova T.S., Zadneprianets M.G., Ilyina E.V., Jekhov L., Krasavin E.A., Kozhina R.A., Kuzmina E.A., Kulikova E.A., Smirnova E.V., Tiounchik S.I.* Formation of Direct and Enzymatic DNA Double-Strand Breaks in the Presence of Repair Inhibitors after Exposure to Radiations of Different Quality // *Phys. Part. Nucl. Lett.* 2018. V. 15, No. 6. P. 700–710.
11. *Boreyko A.V., Zadneprianets M.G., Chausov V.N., Hramko T.S., Kozhina R.A., Kuzmina E.A., Tiounchik S.I., Krasavin E.A.* Combined Action of DNA Synthesis Inhibitors and Accelerated Protons on Malignant Tumor Cells // *Phys. Part. Nucl. Lett.* 2023. V. 20, No. 4. P. 683–689.
12. *Miller M.R., Chinault D.N.* Evidence that DNA Polymerases Alpha and Beta Participate Differentially in DNA Repair Synthesis Induced by Different Agents // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257, No. 1. P. 46–49.
13. *Gowda A.S.P., Polizzi J.M., Eckert K.A., Spratt T.E.* Incorporation of Gemcitabine and Cytarabine into DNA by DNA Polymerase β and Ligase III/XRCC1 // *Biochemistry.* 2010. V. 49, No. 23. P. 4833–4840.
14. *Zamulaeva I.A., Matchuk O.N., Selivanova E.I., Mosina V.A., Abramova M.R., Saburov V.O., Koryakin S.N., Ivanov S.A., Kaprin A.D., Boreyko A.V., Chausov V.N., Krasavin E.A.* Effects of Fractionated Proton Irradiation in Combination with 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine on B16 Murine Melanoma *in vivo* // *Phys. Part. Nucl. Lett.* 2024. V. 21, No. 6. P. 1208–1218.
15. *Krasavin E.A., Boreyko A.V., Zadnepryanets M.G., Ilyina E.V., Kozhina R.A., Kuzmina E.A., Kulikova E.A., Smirnova E.V., Timoshenko G.N., Tiounchik S.I., Chausov V.N.*

Effect of DNA Synthesis Inhibitors on the Biological Efficiency of a Proton Beam in a Modified Bragg Peak // *Phys. Part. Nucl. Lett.* 2019. V. 16. P. 153–158.

16. Allison J., Amako K., Apostolakis J. et al. Recent Developments in Geant4 // *Nucl. Instr. Meth. A.* 2016. V. 835. P. 186–225.
17. Taschereau R., Chow P.L., Cho J.S., Chatziioannou A.F. A MicroCT X-Ray Head Model for Spectra Generation with Monte Carlo Simulations // *Nucl. Instr. Meth. A.* 2006. V. 569, No. 2. P. 373–377.

Получено 14 июля 2025 г.