

Л.А. Ромодин¹, Е.И. Яшкина¹, А.А. Московский²

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЯБЛОЧНОЙ, ЯНТАРНОЙ И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТ НА РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК A549 В КУЛЬТУРЕ

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва² Российский биотехнологический университет, Москва

Контактное лицо: Леонид Александрович Ромодин, e-mail: rla2904@mail.ru

РЕФЕРАТ

Актуальность: Ряд исследователей считает перспективным направлением изучение радиозащитных свойств нетоксичных или малотоксичных природных веществ. Особое место среди них занимают антиоксиданты и участники базовых реакций метаболизма. Во избежание методологических ошибок при выполнении данных исследований необходимо провести ряд дополнительных экспериментов. К примеру, для проведения исследований свойств различных веществ на культурах клеток с использованием планшетных ридеров предварительно необходимо убедиться в том, что данные вещества не влияют на способность клеток к адсорбции на дно лунок планшета и не препятствуют пролиферации клеток. И если такое влияние будет обнаружено, дальнейшие эксперименты с данными веществами необходимо планировать с учётом полученной информации.

Цель: Изучение влияния аскорбиновой, яблочной и янтарной кислот на способность клеток аденокарциномы лёгкого (A549) к адгезии в 96-луночном планшете с последующим началом пролиферации методом регистрации флуоресценции с использованием флуорофора Hoechst-33342.

Методология: Эксперимент проводился в 96-луночном планшете. Рабочая концентрация Hoechst-33342 составляла 1 мкг/мл (1,62 мкМ). Флуоресценция регистрировалась на длине волны 460 нм при возбуждении проб светом длиной волны 355 нм. В эксперименте по изучению влияния аскорбата, малата и сукцината на адгезию и пролиферацию клеток в ячейки планшета вносилось по 20 000 клеток и раствор одного из указанных веществ в рабочей концентрации 2 мМ. Число клеток в лунках оценивалось на основании флуоресценции Hoechst-33342 спустя 1 сут инкубации.

Результат: В пробах, содержащих 2 мМ янтарную и аскорбиновую кислоты, наблюдалось статистически значимое снижение интенсивности флуоресценции по сравнению с пробой, не содержащей препарат. Это позволяет предположить, что данные соединения негативно влияют на ростовые свойства культуры A549, тормозя адгезию клеток или замедляя их пролиферацию.

Область применения результатов и выводы: Полученные результаты необходимы для методологически верного планирования дальнейших исследований на модели клеточной линии A549 с использованием флуоресцентных методов, в том числе исследований по изучению радиозащитных свойств аскорбата, малата и сукцината при воздействии редкоизионизирующего и нейтронного излучения.

Ключевые слова: культура клеток, A549, аскорбиновая кислота, сукцинат, яблочная кислота, Hoechst-33342, планшетный флуориметр, оценка влияния

Для цитирования: Ромодин Л.А., Яшкина Е.И., Московский А.А. Флуориметрическая оценка влияния яблочной, янтарной и аскорбиновой кислот на ростовые свойства клеток A549 в культуре // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69. № 1. С. 28–32. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-1-28-32

L.A. Romodin¹, E.I. Yashkina¹, A.A. Moskovskij²

Fluorimetric Evaluation of the Effect of Malic, Succinic and Ascorbic Acids on the Growth Properties of A549 Cells in Culture

¹ A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia² Russian Biotechnological University, Moscow, Russia

Contact person: L.A. Romodin, e-mail: rla2904@mail.ru

ABSTRACT

Relevance: A number of researchers consider the study of the radioprotective properties of non-toxic or low-toxic natural substances to be a promising direction. A special place among them is occupied by antioxidants and participants in the basic reactions of metabolism. In order to avoid methodological errors when performing these studies, it is necessary to conduct a number of additional experiments. For example, in order to study the properties of various substances on cell cultures using tablet readers, it is first necessary to make sure that these substances do not affect the ability of cells to adsorb to the bottom of the wells of the tablet and do not interfere with cell proliferation. And if such an influence is detected, further experiments with these substances should be planned taking into account the information received.

Purpose: To search the effect of ascorbic, malic and succinic acids on the ability of lung adenocarcinoma cells (A549) to adhere in a 96-well plate, followed by the onset of proliferation by fluorescence registration method using Hoechst-33342 fluorophore.

Methodology: The experiment was carried out in a 96-well tablet. The working concentration of Hoechst-33342 was 1 µg/ml (1.62 µM). Fluorescence was recorded at a wavelength of 460 nm when the samples were excited by light with a wavelength of 355 nm. In an experiment to study the effect of ascorbate, malate and succinate on cell adhesion and proliferation, 20,000 cells and a solution of one of these

substances in a working concentration of 2 mM were introduced into the cells of the tablet. The number of cells in the wells was estimated based on the fluorescence of Hoechst-33342 after a day of incubation.

Result: In samples containing 2 mM succinic acid and ascorbic acid, a statistically significant decrease in the intensity of fluorescence was observed compared with a sample that did not contain the drug. This suggests that these compounds negatively affect the growth properties of the A549 culture: they inhibit cell adhesion or slow down their proliferation.

Scope of the results and conclusions: The results obtained are necessary for the methodologically correct planning of the most detailed studies on the A549 cell line model using fluorescent methods, including studies on the radioprotective properties of ascorbate, malate and succinate under the influence of rare ionizing and neutron radiation.

Keywords: cell culture, A549, ascorbic acid, succinate, malic acid, Hoechst-33342 flatbed fluorimeter, influence estimation

For citation: Romodin LA, Yashkina EI, Moskovskij AA. Fluorimetric Evaluation of the Effect of Malic, Succinic and Ascorbic Acids on the Growth Properties of A549 Cells in Culture. Medical Radiology and Radiation Safety. 2024;69(1):28–32. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-1-28-32

Введение

По причине высокой химической токсичности всех эффективных известных на сегодняшний момент радиопротекторов поиск новых, менее токсичных средств остаётся актуальной задачей [1]. И всё больший интерес в последнее время уделяется так называемым природным соединениям: естественным метаболитам и антиоксидантам с низкой токсичностью [2].

Классическими примерами таких веществ, для которых были описаны радиозащитные свойства, является аскорбиновая кислота [3] и янтарная кислота [4]. Предположительно, это обусловлено их антиоксидантными свойствами. Вещества, обладающие ими, могут нивелировать свободно-радикальные реакции, развивающиеся при воздействии на организм ионизирующего излучения [5, 6].

С этой точки зрения, перспективным также представляется изучение радиозащитных свойств малата, для которого ранее также была показана способность увеличивать антиоксидантный потенциал клеток [7, 8].

В качестве экспериментальной модельной системы для проведения подобных исследований можно использовать культуру клеток. Её можно подвергать воздействию препаратов перед, после или во время облучения. Однако при планировании экспериментов, предполагающих предварительную длительную инкубацию клеток в растворе изучаемого вещества, необходимо учитывать, что указанное вещество может оказывать влияние на ростовые свойства культуры: замедлять адгезию клеток на дно культурального сосуда, замедлять или увеличивать пролиферацию клеток или вообще вызывать апоптоз или иной тип клеточной гибели. Всё это может привести к большому различию в количестве клеток в контрольной и опытной пробе. А это повлечёт за собой серьёзные ошибки при обработке результатов экспериментов.

Особенно это актуально при использовании красителей, флуоресцирующих внутри клеток: в данном случае яркость свечения образца будет зависеть не только от концентрации маркерных молекул в клетке, но и от числа клеток в пробе. И в этом случае более сильный сигнал может быть зафиксирован от пробы, клетки в которой содержат меньше маркерных молекул по сравнению с другой пробой, если в первой пробе число клеток больше, чем во второй.

Поэтому первоначально необходимо выяснить, в какой степени вещества влияют на ростовые свойства клеточной культуры.

И так как в литературе имеются сведения о цитостатической активности аскорбиновой кислоты [9–11] и её производных [12–14], цитотоксическом действии янтарной кислоты на некоторые клеточные линии [15–17], мы поставили цель изучить влияние аскорбиновой, яблочной и янтарной кислот на способность клеток на при-

мере клеточной линии аденокарциномы лёгкого (A549) к адгезии в 96-луночном планшете с последующим началом пролиферации методом регистрации флуоресценции с использованием флуорофора Hoechst-33342.

На рис. 1 представлены формулы изучаемых веществ.

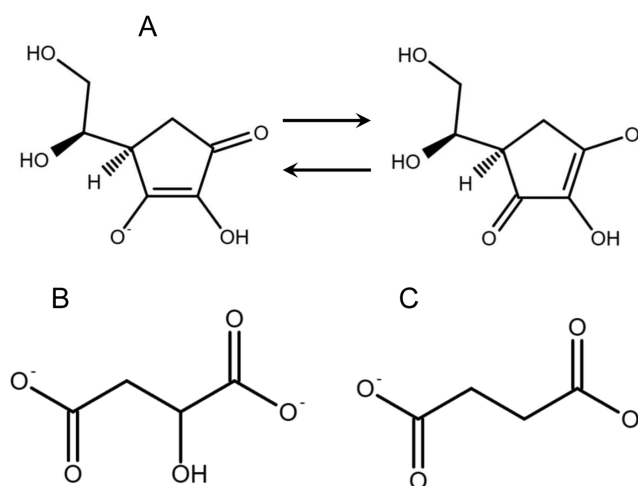


Рис. 1. Структурные формулы изучаемых веществ: А. Аскорбат, В. Малат, С. Сукцинат

Fig. 1. Structural formulas of the studied substances: A. Ascorbate, B. Malate, C. Succinate

Материал и методы

Эксперимент проводился в 96-луночном планшете с использованием клеточной линии аденокарциномы лёгкого человека A549 (American Type Culture Collection, США). В ячейки планшета мы вносили по 20000 клеток в 100 мкл полной среды RPMI 1640. Среда была приготовлена путём добавления к 450 мл среды RPMI Medium 1640 1x (GIBCO (Life Technologies (Invitrogen)), США) 50 мл инактивированной Fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific США), 146 мг L-глутамин (ПанЭко, РФ), смеси 25000 ед. пенициллина и 25 мг стрептомицина (ПанЭко, Россия). Далее в ячейки планшета было внесено по 100 мкл 4 mM раствора яблочной кислоты, янтарной кислоты или аскорбиновой кислоты. В итоге концентрация данных веществ в планшете составила 2 mM.

Далее планшет инкубировался в течение 1 сут в CO₂-инкубаторе при 37 °C. После этого из каждой ячейки было отобрано по 40 мкл клеточной среды и внесено 40 мкл раствора флуоресцирующего красителя Hoechst-33342 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) концентрацией 5 мкг/мл (8,1 мкМ). Структурная формула данного флуорофора изображена на рис. 2.

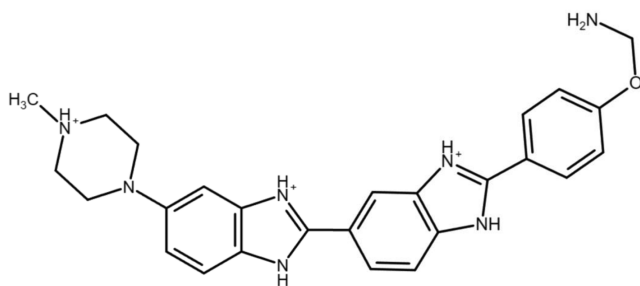


Рис. 2. Структурная формула Hoechst-33342
Fig. 2. Structural formula of Hoechst-33342

Далее с использованием планшетного флуориметра FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Германия) была зарегистрирована интенсивность флуоресценции (коэффициент усиления 1500) на длине волны 460 нм при возбуждении проб светом длиной волны 355 нм. В качестве пробы сравнения, значение интенсивности флуоресценции в которой вычиталось из таковых значений в других пробах, выступила проба, в которую вносились только клетки в среде, без внесения изучаемых препаратов. Каждая проба выполнялась в 8 повторностях.

Результаты и обсуждение

Краситель Hoechst-33342 связывается с ДНК клеток, а потому, регистрируя его флуоресценцию возможно оценивать количество клеток в пробе [18, 19].

На рис. 3 представлены средние значения интенсивности флуоресценции в образцах, в течение 1 сут инкубированных в 2 мМ растворах яблочной, янтарной или аскорбиновой кислот, по сравнению с интенсивностью контрольной пробы, содержащей только клетки линии A549. Интенсивность флуоресценция проб, содержащих сукцинат и малат, статистически значимо ниже контроля.

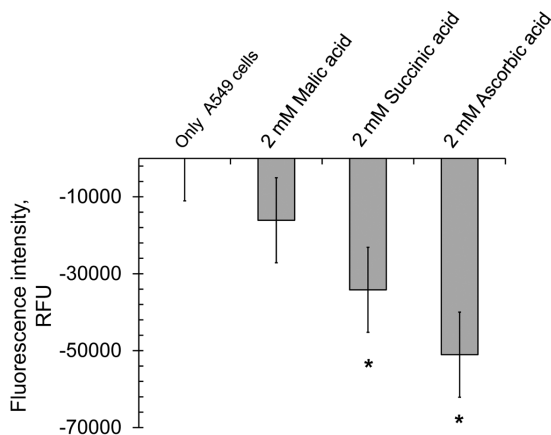


Рис. 3. Уменьшение интенсивности флуоресценции Hoechst-33342 (рабочая концентрация 1 мкг/мл (1,62 мкМ)) под действием яблочной, янтарной и аскорбиновой кислот по сравнению с контрольной пробой после суточной инкубации – доказательство торможения роста клеток в культуре под действием данных веществ. *статистически значимое ($p = 95\%$) отличие от контроля (клетки без внесения указанных веществ), данные представлены в виде среднее арифметическое \pm предельная ошибка среднего

Fig. 3. The decrease in the fluorescence intensity of Hoechst-33342 (used concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1.62 μM) under the action of malic, succinic and ascorbic acids compared with the control sample after daily incubation is evidence of inhibition of cell growth in culture under the action of these substances. *statistically significant ($p = 95\%$) difference from the control (cells without the introduction of these substances), the data is presented in the form of arithmetic mean \pm marginal error of the mean

На основании представленных на рис. 3 данных, можно сделать вывод о том, что янтарная и аскорбиновая кислоты достоверно угнетают адгезию и/или рост клеток линии A549. Этот факт необходимо учитывать при проведении исследований, предполагающих предварительную инкубацию клеток в растворах данных веществ. В этом случае нужно будет либо отказаться от данной схемы проведения эксперимента, либо нормировать пробы по содержанию клеток в них на основании проб, содержащих только среду инкубации.

Относительно малата целесообразно сделать точно такой же вывод. Хотя данное вещество не показало статистически значимого угнетения ростовых свойств клеток по сравнению с контролем, оно не показало и статистически значимых отличий от сукцината, достоверно подавляющего клеточную культуру A549.

Полученные нами результаты, в целом, согласуются с информацией, представленной в мировой литературе. Мы показали угнетение ростовых свойств раковой культуры клеток аденокарциномы лёгкого.

Проиллюстрированный на рис. 3 результат мог быть получен по причинам того, что аскорбиновая и янтарная кислоты препятствовали адгезии клеток на дно лунок планшета, или же потому, что данные вещества угнетали клеточный рост, в сравнении с ячейками планшета, в которые их не вносили.

Ранее была описана цитостатическая активность аскорбиновой кислоты [9–11] и её производных [12–14] в концентрациях, сравнимых с используемой нами. Аскорбиновая кислота может каким-то образом снижать жизнеспособность клеток. Так, авторы [20] сообщают, что аскорбат повышает чувствительность клеток остеосаркомы человека к цитостатическому эффекту цисплатина.

Однако для того, чтобы сказать, проявляет ли аскорбат цитостатические свойства в равной степени для здоровых и раковых клеток, на данный момент сведений недостаточно.

В литературе также имеются сведения и о цитостатических и даже – апоптотических свойствах янтарной кислоты. Однако эти сведения весьма неоднозначны.

Авторы [16] показали, что янтарная кислота в концентрации 25 мкМ и 50 мкМ после 24-часовой инкубации заметно снижает жизнеспособность клеток карциномы почки человека, линия САКИ-2 (на 89,77 и 90,77%), и линия АСНН (на 41,57 и 54,54%).

Несколько ранее было показано, что янтарная кислота в концентрациях 5 и 10 мкМ приводят к апоптозу при раке эндометрия, при этом данного эффекта не наблюдалось в контрольной линии из здоровых клеток лёгких [17].

Схожий результат получили авторы [15], которые показали апоптотический эффект янтарной кислоты концентрацией 25 мМ и 50 мМ на клетки линии T-ALL (Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз), не обнаружив значимого цитотоксического действия сукцината на фибробласты (линия MRC-5).

Однако однозначно говорить о том, что сукцинат угнетает раковые клетки, не приходится. Все описанные выше результаты получены с использованием культур клеток. В то время как в исследовании *in vivo* был получен противоположный результат. В частности, было показано, что янтарная кислота индуцирует устойчивость злокачественной опухоли к иммунотерапии при колоректальном раке [21].

Данный результат не вызывает удивления, так как янтарная кислота – это базовый метаболит, способствующий эффективному клеточному дыханию, напрямую поставляя электроны в митохондриальную электрон-

транспортную цепь, так как фермент сукцинат-дегидрогеназа является комплексом дыхательной цепи митохондрий, восстанавливая убинон [22, 23]. И ингибирование сукцинат-дегидрогеназы может способствовать угнетению раковых клеток [22].

Вполне возможно, что эффект от воздействия сукцината на раковые клетки зависит от того, какой тип дыхания, анаэробный или аэробный, они используют. И если клетки используют исключительно гликолитический тип дыхания, янтарная кислота может оказывать на них супрессорное действие. Кроме того, необходимо учитывать, что одно и то же вещество может проявлять различные эффекты в целом организме и в клеточной культуре.

В полученных нами данных особый интерес вызывает то, что статистически значимое торможение роста культуры A549 аденокарциномы лёгкого относительно проб, не подвергшихся воздействию изучаемых веществ, вызвали сукцинат и аскорбат. А среди трёх изучаемых веществ именно для этих двух в литературе имеются сообщения о возможном радиозащитном эффекте [3, 4]. То есть можно предположить, что янтарная и аскорбиновая кислоты могут угнетать рост злокачественных новообразований и при этом смягчать последствия воздействия на организм ионизирующего излучения.

Это приводит к мысли о целесообразности использования данных веществ при проведении лучевой терапии онкологических заболеваний. Ведь благодаря их радиозащитным свойствам удастся в некоторой степени нивелировать негативные последствия терапии, но при этом, одновременно возрастёт и эффективность подобного

лечения за счёт того, аскорбиновая и янтарная кислоты тормозят деление клеток.

Однако рассуждая относительно полученного результата, необходимо указать, что изучаемые вещества могли не тормозить рост клеток, а препятствовать их адгезии на дно ячейки планшета. Или же причина эффекта, проиллюстрированная на рис. 3, кроется и в нарушении адгезии клеток, и в торможении пролиферации прикрепившихся.

Заключение

Таким образом, мы показали статистически значимое угнетение роста клеток линии A549 в культуре под действием 2 мМ янтарной и аскорбиновой кислот. И, хотя для 2 мМ яблочной кислоты подобного статистически значимого эффекта обнаружено не было, показанное под её действием угнетение роста клеточной культуры также нельзя игнорировать.

Полученные результаты необходимы для методологически верного планирования дальнейших исследований аскорбата, малата и сукцината на модели клеточной линии A549 с использованием флуоресцентных методов. При проведении экспериментов, предполагающих длительную предварительную инкубацию клеток в растворах данных веществ, необходимо учитывать то, что число клеток в данных пробах будет ниже такового в пробах, в которые указанные вещества не вносятся.

В будущем планируются исследования возможных защитных свойств аскорбата, малата и сукцината при воздействии редкоизирующего и нейтронного излучения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Рождественский Л.М. Проблемы разработки отечественных противолучевых средств в кризисный период: поиск актуальных направлений развития // Радиационная биология. Радиоэкология. 2020. Т.60, No. 3. С. 279–290. doi: 10.31857/S086980312003011X.
2. Raj S., Manchanda R., Bhandari M., Alam M.S. Review on Natural Bioactive Products as Radioprotective Therapeutics: Present and Past Perspective // Current Pharmaceutical Biotechnology. 2022. V.23, No. 14. P. 1721–1738. doi: 10.2174/1389201023666220110104645.
3. Gonzalez E., Cruces M.P., Pimentel E., Sanchez P. Evidence that the Radioprotector Effect of Ascorbic Acid Depends on the Radiation Dose Rate // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2018. V.62, P. 210–214. doi: 10.1016/j.etap.2018.07.015.
4. Закирова Г.Ш., Ишмухаметов К.Т., Сайтов В.Р., Кадиков И.Р. Эффективность применения солей фумаровой и янтарной кислот при комбинированном поражении кроликов // Вестник Марийского государственного университета. Серия: сельскохозяйственные науки. Экономические науки. 2022. Т.8, № 3. С. 256–263. doi: 10.30914/2411-9687-2022-8-3-256-263.
5. Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина Е.М., Пальмина Н.П., Храпова Н.Г. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М.: Наука, 1975. 213 с.
6. Кузин А.М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии. М.: Наука, 1986. 282 с.
7. Mousavi A., Pourakbar L., Siavash Moghaddam S. Effects of Malic Acid and EDTA on Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes of Okra (*Abelmoschus Esculentus* L.) Exposed to Cadmium Stress // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2022. No. 248. P. 114320. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114320.
8. Zeng X., Wu J., Wu Q., Zhang J. L-Malate Enhances the Gene Expression of Carried Proteins and Antioxidant Enzymes in Liver of Aged Rats // Physiological Research. 2015. V.64, No. 1. P. 71–78. doi: 10.33549/physiolres.932739.
9. Vuuyuri S.B., Rinkinen J., Worden E., Shim H., Lee S., Davis K.R. Ascorbic Acid and a Cytostatic Inhibitor of Glycolysis Synergistically Induce Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells // PLoS One. 2013. V.8, No. 6. P. e67081. doi: 10.1371/journal.pone.0067081.
10. Fromberg A., Gutsch D., Schulze D., Vollbracht C., Weiss G., Czubayko F., Aigner A. Ascorbate Exerts Anti-Proliferative Effects Through Cell Cycle Inhibition and Sensitizes Tumor Cells Towards Cytostatic Drugs // Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 2011. V.67, No. 5. P. 1157–1166. doi: 10.1007/s00280-010-1418-6.
11. Reang J., Sharma P.C., Thakur V.K., Majeed J. Understanding the Therapeutic Potential of Ascorbic Acid in the Battle to Overcome Cancer // Biomolecules. 2021. V.11, No. 8. P. 1130. doi: 10.3390/biom11081130.
12. Gazivoda T., Wittine K., Lovric I., Makuc D., Plavec J., Cetina M., Mrvos-Sermek D., Suman L., Kralj M., Pavelic K., Mintas M., Raic-Malic S. Synthesis, Structural Studies, and Cytostatic Evaluation of 5,6-di-O-Modified L-Ascorbic Acid Derivatives // Carbohydrate Research. 2006. V.341, No. 4. P. 433–442. doi: 10.1016/j.carres.2005.12.010.
13. Gazivoda T., Sokcevic M., Kralj M., Suman L., Pavelic K., De Clercq E., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Mintas M., Raic-Malic S. Synthesis and Antiviral and Cytostatic Evaluations of the New C-5 Substituted Pyrimidine and Furo[2,3-d]Pyrimidine 4',5'-Didehydro-L-Ascorbic Acid Derivatives // Journal of Medicinal Chemistry. 2007. V.50, No. 17. P. 4105–4112. doi: 10.1021/jm070324z.
14. Gazivoda T., Raic-Malic S., Marjanovic M., Kralj M., Pavelic K., Balzarini J., De Clercq E., Mintas M. The Novel C-5 Aryl, Alkenyl and Alkynyl Substituted Uracil Derivatives of L-Ascorbic Acid: Synthesis, Cytostatic, and Antiviral Activity Evaluations // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2007. V.15, No. 2. P. 749–758. doi: 10.1016/j.bmc.2006.10.046.
15. Ertugrul B., Iplik E.S., Cakmakoglu B. In Vitro Inhibitory Effect of Succinic Acid on T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines // Archives of Medical Research. 2021. V.52, No. 3. P. 270–276. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.10.022.
16. Kasarci G., Ertugrul B., Iplik E.S., Cakmakoglu B. The Apoptotic Efficacy of Succinic Acid on Renal Cancer Cell Lines // Medical Oncology. 2021. V.38, No. 12. P. 144. doi: 10.1007/s12032-021-01577-9.
17. Iplik E.S., Catmakas T., Cakmakoglu B. A New Target for the Treatment of Endometrium Cancer by Succinic Acid // Cellular and Molecular Biology. 2018. V.64, No. 1. P. 60–63. doi: 10.14715/cmb/2018.64.1.11.
18. Fuchs H., Jahn K., Hu X., Meister R., Binter M., Framme C. Breaking a Dogma: High-Throughput Live-Cell Imaging in Real-Time with Hoechst 33342 // Advanced Healthcare Materials. 2023. V.12, No. 20. P. e2300230. doi: 10.1002/adhm.202300230.
19. Cordeiro M.M., Filipe H.A.L., Santos P.D., Samelo J., Ramalho J.P.P., Loura L.M.S., Moreno M.J. Interaction of Hoechst 33342 with POPC Membranes at Different pH Values // Molecules. 2023. V.28, No. 15. P. 5640. doi: 10.3390/molecules28155640.
20. Oka N., Komuro A., Amano H., Dash S., Honda M., Ota K., Nishimura S., Ueda T., Akagi M., Okada H. Ascorbate Sensitizes Human Osteosarcoma Cells to the Cytostatic Effects of Cisplatin // Pharmacology Research & Perspectives. 2020. V.8, No. 4. P. e00632. doi: 10.1002/prp2.632.

21. Jiang S.S., Xie Y.L., Xiao X.Y., Kang Z.R., Lin X.L., Zhang L., Li C.S., Qian Y., Xu P.P., Leng X.X., Wang L.W., Tu S.P., Zhong M., Zhao G., Chen J.X., Wang Z., Liu Q., Hong J., Chen H.Y., Chen Y.X., Fang J.Y. Fusobacterium Nucleatum-Derived Succinic Acid Induces Tumor Resistance to Immunotherapy in Colorectal Cancer // *Cell Host & Microbe*. 2023. V.31, No. 5. P. 781–797 e789. doi: 10.1016/j.chom.2023.04.010.
22. Ragab E.M., El Gamal D.M., Mohamed T.M., Khamis A.A. Therapeutic Potential of Chrysin Nanoparticle-Mediation Inhibition of Succinate Dehydrogenase and Ubiquinone Oxidoreductase in Pancreatic and Lung Adenocarcinoma // *European Journal of Medical Research*. 2022. V.27, No. 1. P. 172. doi: 10.1186/s40001-022-00803-y.
23. Ragab E.M., El Gamal D.M., Mohamed T.M., Khamis A.A. Impairment of Electron Transport Chain and Induction of Apoptosis by Chrysin Nanoparticles Targeting Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase in Pancreatic and Lung Cancer Cells // *Genes & Nutrition*. 2023. V.18, No. 1. P. 4. doi: 10.1186/s12263-023-00723-4.

REFERENCES

1. Rozhdestvenskiy L.M. Difficulties in Radiation Counter Measure Preparations Development in Russian Crisis Period: Actual Approaches Searching. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*. 2020;60;3:279–290. doi: 10.31857/S086980312003011X (In Russ.).
2. Raj S., Manchanda R., Bhandari M., Alam M.S. Review on Natural Bioactive Products as Radioprotective Therapeutics: Present and Past Perspective. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2022;23;14:1721–1738. doi: 10.2174/1389201023666220110104645.
3. Gonzalez E., Cruces M.P., Pimentel E., Sanchez P. Evidence that the Radioprotector Effect of Ascorbic Acid Depends on the Radiation Dose Rate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;62:210–214. doi: 10.1016/j.etap.2018.07.015.
4. Zakirova G. Sh., Ishmukhametov K.T., Saitov V.R., Kadikov I.R. The Effectiveness of the Use of Fumaric and Succinic Acids Salts in Combined Lesions of Rabbits. *Vestnik Mariyskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya: Selskhozaystvennyye Nauki. Ekonomicheskkiye Nauki = Vestnik of the Mari State University. Chapter "Agriculture. Economics"*. 2022;8;31:256–263. doi: 10.30914/2411-9687-2022-8-3-256-263 (In Russ.).
5. Burlakova E.B., Alesenko A.V., Molochkina E.M., Pal'mina N.P., Khrapova N.G. *Bioantioxidanty v Luchevom Porazhenii i Zlokachestvennom Roste = Bioantioxidants in Radiation Damage and Malignant Growth*. Moscow, Nauka Publ., 1975. 213 p. (In Russ.).
6. Kuzin A.M. *Strukturno-Metabolicheskaya Teoriya v Radiobiologii = Structural and Metabolic Theory in Radiobiology*. Moscow, Nauka-Publ., 1986. 282 p. (In Russ.).
7. Mousavi A., Pourakbar L., Siavash Moghaddam S. Effects of Malic Acid and EDTA on Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes of Okra (*Abelmoschus Esculentus* L.) Exposed to Cadmium Stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2022;248:114320. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114320.
8. Zeng X., Wu J., Wu Q., Zhang J. L-Malate Enhances the Gene Expression of Carried Proteins and Antioxidant Enzymes in Liver of Aged Rats. *Physiological Research*. 2015;64;1:71–78. doi: 10.33549/physiolres.932739.
9. Vuuyuri S.B., Rinkinen J., Worden E., Shim H., Lee S., Davis K.R. Ascorbic Acid and a Cytostatic Inhibitor of Glycolysis Synergistically Induce Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS One*. 2013;8;6:e67081. doi: 10.1371/journal.pone.0067081.
10. Fromberg A., Gutsch D., Schulze D., Vollbracht C., Weiss G., Czubyko F., Aigner A. Ascorbate Exerts Anti-Proliferative Effects Through Cell Cycle Inhibition and Sensitizes Tumor Cells Towards Cytostatic Drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2011;67;5:1157–1166. doi: 10.1007/s00280-010-1418-6.
11. Reang J., Sharma P.C., Thakur V.K., Majeed J. Understanding the Therapeutic Potential of Ascorbic Acid in the Battle to Overcome Cancer. *Biomolecules*. 2021;11;8:1130. doi: 10.3390/biom11081130.
12. Gazivoda T., Wittine K., Lovric I., Makuc D., Plavec J., Cetina M., Mrvos-Sermek D., Suman L., Kralj M., Pavelic K., Mintas M., Raic-Malic S. Synthesis, Structural Studies, and Cytostatic Evaluation of 5,6-di-O-Modified L-Ascorbic Acid Derivatives. *Carbohydrate Research*. 2006;341;4:433–442. doi: 10.1016/j.carres.2005.12.010.
13. Gazivoda T., Sokcevic M., Kralj M., Suman L., Pavelic K., De Clercq E., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Mintas M., Raic-Malic S. Synthesis and Antiviral and Cytostatic Evaluations of the New C-5 Substituted Pyrimidine and Furo[2,3-d]Pyrimidine 4',5'-Didehydro-L-Ascorbic Acid Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007;50;17:4105–4112. doi: 10.1021/jm070324z.
14. Gazivoda T., Raic-Malic S., Marjanovic M., Kralj M., Pavelic K., Balzarini J., De Clercq E., Mintas M. The Novel C-5 Aryl, Alkenyl and Alkynyl Substituted Uracil Derivatives of L-Ascorbic Acid: Synthesis, Cytostatic, and Antiviral Activity Evaluations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007;15;2:749–758. doi: 10.1016/j.bmc.2006.10.046.
15. Ertugrul B., Iplik E.S., Cakmakoglu B. In Vitro Inhibitory Effect of Succinic Acid on T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. *Archives of Medical Research*. 2021;52;3:270–276. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.10.022.
16. Kasarci G., Ertugrul B., Iplik E.S., Cakmakoglu B. The Apoptotic Efficacy of Succinic Acid on Renal Cancer Cell Lines. *Medical Oncology*. 2021;38;12:144. doi: 10.1007/s12032-021-01577-9.
17. Iplik E.S., Catmakas T., Cakmakoglu B. A New Target for the Treatment of Endometrial Cancer by Succinic Acid. *Cellular and Molecular Biology*. 2018;64;1:60–63. doi: 10.14715/cmb/2018.64.1.11.
18. Fuchs H., Jahn K., Hu X., Meister R., Binter M., Framme C. Breaking a Dogma: High-Throughput Live-Cell Imaging in Real-Time with Hoechst 33342. *Advanced Healthcare Materials*. 2023;12;20:e2300230. doi: 10.1002/adhm.202300230.
19. Cordeiro M.M., Filipe H.A.L., Santos P.D., Samelo J., Ramalho J.P.P., Laura L.M.S., Moreno M.J. Interaction of Hoechst 33342 with POPC Membranes at Different pH Values. *Molecules*. 2023;28;15:5640. doi: 10.3390/molecules28155640.
20. Oka N., Komuro A., Amano H., Dash S., Honda M., Ota K., Nishimura S., Ueda T., Akagi M., Okada H. Ascorbate Sensitizes Human Osteosarcoma Cells to the Cytostatic Effects of Cisplatin. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2020;8;4:e00632. doi: 10.1002/prp2.632.
21. Jiang S.S., Xie Y.L., Xiao X.Y., Kang Z.R., Lin X.L., Zhang L., Li C.S., Qian Y., Xu P.P., Leng X.X., Wang L.W., Tu S.P., Zhong M., Zhao G., Chen J.X., Wang Z., Liu Q., Hong J., Chen H.Y., Chen Y.X., Fang J.Y. Fusobacterium Nucleatum-Derived Succinic Acid Induces Tumor Resistance to Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Cell Host & Microbe*. 2023;31;5:781–797 e789. doi: 10.1016/j.chom.2023.04.010.
22. Ragab E.M., El Gamal D.M., Mohamed T.M., Khamis A.A. Therapeutic Potential of Chrysin Nanoparticle-Mediation Inhibition of Succinate Dehydrogenase and Ubiquinone Oxidoreductase in Pancreatic and Lung Adenocarcinoma. *European Journal of Medical Research*. 2022;27;1:172. doi: 10.1186/s40001-022-00803-y.
23. Ragab E.M., El Gamal D.M., Mohamed T.M., Khamis A.A. Impairment of Electron Transport Chain and Induction of Apoptosis by Chrysin Nanoparticles Targeting Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase in Pancreatic and Lung Cancer Cells. *Genes & Nutrition*. 2023;18;1:4. doi: 10.1186/s12263-023-00723-4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР «Технология-3» (номер регистрации НИР в системе ЕГИСУ НИОКТР: 1230113001053).

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.10.2023. Принята к публикации: 27.11.2023.

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

Financing. The work was carried out within the framework of the research project "Technology-3" (registration number of the research project in the EGISU R&D system: 1230113001053).

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.10.2023. Accepted for publication: 27.11.2023.