

Л.А. Ромодин<sup>1</sup>, Е.И. Яшкина<sup>1</sup>, А.А. Московский<sup>2</sup>**ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РИБОКСИНА, МЕДНОГО ХЛОРОФИЛЛИНА, ТРОЛОКСА И РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ ИНДРАЛИНА НА РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК A549 В КУЛЬТУРЕ**<sup>1</sup> Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва<sup>2</sup> Российский биотехнологический университет, Москва

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

**РЕФЕРАТ**

В настоящее время наиболее часто в качестве экспериментальной модельной системы в биологических исследованиях используют культуры клеток. Однако для корректного планирования исследований с использованием данной модельной системы требуется учитывать множество аспектов. Так, для возможности правильной оценки действия радиозащитных препаратов на клетки предвзвешенно нужно изучить влияние данных веществ на свойства клеток в культуре. И главным таким свойством для работ с использованием планшетных ридеров является способность клеток к адгезии на дне планшета и скорость пролиферации клеток. Настоящая работа посвящена изучению влияния рибоксина (инозина), медного хлорофиллина, тролокса и индралина на ростовые свойства клеток в культуре на примере клеточной линии A549 – аденокарциномы лёгкого человека. Рибоксин, хлорофиллин и тролокс являются перспективными соединениями с точки зрения изучения их радиозащитных свойств. Индралин – это эталонный классический радиопротектор. В настоящем исследовании использована его водорастворимая форма, содержащая винную кислоту, для возможности растворения индралина в воде. Эксперимент заключался в инкубации клеток линии A549 в течение суток в растворе рибоксина (инозина), медного хлорофиллина, тролокса или винной кислоты концентрацией 2 мМ или в смеси 2 мМ винной кислоты и 1,9 мМ индралина с последующей оценкой содержания клеток в пробах по сравнению с клетками, инкубированными без внесения указанных веществ, на основании флуоресценции красителя Hoechst-33342. Дополнительный эксперимент с хлорофиллином заключался в инкубации уже прикрепившихся ко дну планшета клеток с хлорофиллином в диапазоне концентраций 50–500 мкМ в течение 2,5 ч с последующей оценкой содержания оставшихся в планшете клеток. Все изучаемые вещества статистически значимо показали снижение содержания клеток в пробах по сравнению с контролем. В наибольшей степени снижение содержания клеток наблюдалось в пробе с хлорофиллином, в наименьшей – с рибоксином. В результате дополнительного опыта по инкубации уже прикрепившихся клеток в растворе хлорофиллина концентрациями 50–500 мкМ было показано, что данное вещество дозозависимо угнетает адгезивные свойства клеток линии A549. При этом хлорофиллин уже в концентрации 50 мкМ статистически значимо снижал содержание клеток в пробе после отмывки лунок планшета по сравнению с контрольной пробой. Снижение содержания клеток в пробе, содержащей смесь индралина и винной кислоты, было статистически значимо более выраженным, чем вызванное инкубацией в растворе только винной кислоты. То есть, признанный радиопротектор индралин продемонстрировал выраженное угнетение ростовых свойств клеток линии A549. На основании полученной информации можно сделать вывод о том, что при планировании будущих исследований изученных в настоящей работе веществ на модели культуры клеток необходимо учитывать тот факт, что они угнетают рост клеточной культуры.

**Ключевые слова:** культура клеток, A549, рибоксин, медный хлорофиллин, тролокс, индралин, винная кислота, оценка влияния

**Для цитирования:** Ромодин Л.А., Яшкина Е.И., Московский А.А. Флуориметрическая оценка влияния рибоксина, медного хлорофиллина, тролокса и растворимой формы индралина на ростовые свойства клеток A549 в культуре // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69. № 3. С. 26–34. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-3-26-34

L.A. Romodin<sup>1</sup>, E.I. Yashkina<sup>1</sup>, A.A. Moskovskij<sup>2</sup>**Fluorimetric Evaluation of the Effect of Riboxin, Copper Chlorophyllin, Trolox and the Soluble form of Indralin on the Growth Properties of A549 Cells in Culture**<sup>1</sup> A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia<sup>2</sup> Russian Biotechnological University, Moscow, Russia

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

**ABSTRACT**

Currently, cell cultures are most often used as an experimental model system in biological research. However, to correctly plan studies using this model system, many aspects must be taken into account. Thus, to be able to correctly assess the effect of radioprotective drugs on cells, it is first necessary to study the effect of these substances on the properties of cells in culture. And the main property for work using plate readers is the ability of cells to adhere to the bottom of the plate and the rate of cell proliferation. This work is devoted to the study of human riboxin (inosine), copper chlorophyllin, trolox and indralin, the growth properties of cells in a culture based on the A549 cell line - human lung adenocarcinoma. Riboxin, chlorophyllin and trolox are promising compounds that make it possible to study their radioprotective properties. Indralin is a reference classic radioprotector. This process used a water-soluble form containing tartaric acid to allow indralin to dissolve in water. The experiment consisted of incubating A549 cells for 24 hours in a solution of riboxin (inosine), copper chlorophyllin, Trolox or tartaric acid at a concentration of 2 mM or in a mixture of 2 mM tartaric acid and 1.9 mM indralin, followed by assessment of the cell content in the samples compared to cells incubated without the addition of these substances, based on the fluorescence of the Hoechst-33342 dye. An additional experiment with chlorophyllin consisted in incubating cells with chlorophyllin already attached to the bottom of the tablet in the

concentration range of 50–500  $\mu\text{M}$  for 2.5 hours, followed by an assessment of the content of the remaining cells in the tablet. All studied substances statistically significantly reduced the cell content in the samples compared to the control. The greatest decrease in cell content was observed in the sample with chlorophyllin, and the least – with riboxin. As a result of additional experience in incubating already attached cells in chlorophyllin solution with concentrations of 50–500  $\mu\text{M}$ , it was shown that this substance dose-dependently inhibits the adhesive properties of cells of the A549 line. At the same time, chlorophyllin already at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  statistically significantly reduced the cell content in the sample after washing the wells of the tablet compared with the control sample.

The decrease in cell content in the sample containing a mixture of indralin and tartaric acid was statistically significantly more pronounced than that caused by incubation in a solution of tartaric acid alone. That is, the recognized radioprotector indralin demonstrated a pronounced inhibition of the growth properties of the A549 cell line. Based on the information obtained, we can conclude that when planning future studies of the substances studied in this work on a cell culture model, it is necessary to take into account the fact that they inhibit the growth of the cell culture.

**Keywords:** cell culture, A549, riboxin, copper chlorophyllin, trolox, indralin, tartaric acid, influence estimation

**For citation:** Romodin LA, Yashkina EI, Moskovskij AA. Fluorimetric Evaluation of the Effect of Riboxin, Copper Chlorophyllin, Trolox and the Soluble form of Indralin on the Growth Properties of A549 Cells in Culture. Medical Radiology and Radiation Safety. 2024;69(3):26–34. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-3-26-34

## Введение

В настоящее время весьма широко используются культуры клеток в качестве экспериментальной модельной системы в радиобиологических исследованиях [1–4]. Поэтому крайне важным представляется разработка корректной методологии проведения научных исследований с использованием данной модельной системы.

Так, для корректного планирования исследований с использованием культур клеток необходимо учитывать множество аспектов. И, если речь идёт об исследовании влияния различных факторов на клетки, например изучение способности различных веществ смягчать последствия воздействия ионизирующего излучения, то нужно понимать, как эти факторы по-отдельности действуют на клетки. Именно поэтому перед проведением исследований действия радиозащитных препаратов на модели культур клеток предварительно нужно изучить влияние данных веществ на свойства данных культур.

По причине широкого распространения в последнее время работ с использованием планшетных ридеров и визуализирующих микроскопов особо актуальным представляется исследование влияния признанных и перспективных радиозащитных препаратов на способность клеток к адгезии на дне планшета и на скорость пролиферации клеток. К примеру, ранее нами было показано, что янтарная и аскорбиновая кислоты угнетают ростовые свойства клеток линии A549 в культуре [5].

Цель настоящей работы – изучить влияние рибоксина (инозина), медного хлорофиллина, тролокса и индралина на ростовые свойства клеток в культуре на примере клеточной линии A549 – аденокарциномы лёгкого человека. Формулы изучаемых веществ приведены на рис. 1.

Выбор данных веществ обусловлен сообщениями об их радиозащитных свойствах. Так, известно, что рибоксин обладает генопротекторным эффектом [6–8], а также при введении животным после облучения повышает уровень их выживаемости [9, 10]. Но при этом в литературе имеются сведения о возможной цитостатической активности рибоксина [11]. Поэтому проведение настоящего эксперимента с данным веществом весьма актуально.

Тролокс – это водорастворимая форма витамина E, в ряде исследований данное вещество применяется в качестве эталонного антиоксиданта [12, 13]. А так как состояние окислительного стресса является одной из главных составляющих биологического действия ионизирующего излучения [14, 15], можно предположить, что антиоксидант может проявить радиозащитный эффект. К слову, имеются сообщения, что тролокс снижает степень негативных последствий действия ионизирующего [13] и неионизирующего [16] излучений.

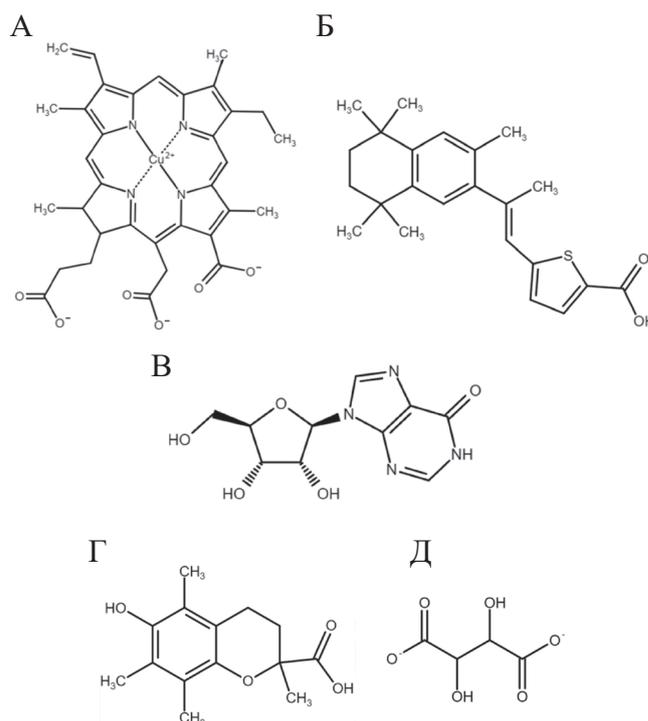


Рис. 1. Структурные формулы изучаемых веществ: (А) хлорофиллин в форме медного комплекса хлорина  $e_6$ ; (Б) индралин, используемый в виде смеси с винной кислотой; (В) рибоксин; (Г) тролокс; (Д) L(+)-винная кислота

Fig. 1. Structural formulas of the studied substances: (A) chlorophyllin in the form of a copper complex of chlorina  $e_6$ ; (B) indralin, used in a mixture with tartaric acid; (C) riboxin; (D) L(+)-tartaric acid

Кроме того, авторы [17] сообщают о противоопухолевой активности конъюгатов тролокса с нитроксидами. Таким образом, тролокс вполне может обладать цитостатическим действием на клеточные культуры. Поэтому в настоящей работе изучается влияние данного вещества на ростовые свойства клеток аденокарциномы лёгкого.

К перспективным радиозащитным средствам также можно отнести и препараты на основе зелёного пигмента растений хлорофилла. В литературе есть сообщения о радиозащитных свойствах самого хлорофилла [18, 19]. Однако существенно чаще предметом изучения радиозащитных свойств выступал водорастворимый продукт омыления хлорофилла – хлорофиллин [20–25]. Анализ информации о радиозащитных свойствах препаратов на основе хлорофилла представлен в обзоре [26].

Для большей устойчивости соединения при производстве хлорофиллина координированный атом магния,

имеющий место в хлорофилле растений, заменяется на атом меди. А циклопентановое кольцо хлорофиллина часто распадается. В этом случае хлорофиллин-а, превращается в вещество, называемое хлорином  $e_6$  (рис. 1А). И очень часто именно хлорин  $e_6$  продаётся фирмами-изготовителями химических реактивов под названием «хлорофиллин».

Анализируя работы, в которых изучали различные свойства хлорофиллина, чаще всего невозможно определить, использовали ли в них непосредственно сам медный хлорофиллин или медный комплекс хлорина  $e_6$ . Однако ввиду практически полной аналогичности данных молекул, их свойства должны быть если не аналогичными, то весьма схожими. И так как исторически сложилось, что словом «хлорофиллин» также называют и хлорин  $e_6$ , что в препарате хлорофиллина могут присутствовать оба вещества и что явных отличий между веществами нет, мы считаем, что, по крайней мере на первом этапе исследований, когда в нашем распоряжении нет собственного производства порфиринов, вполне можно не заострять внимания на разнице между хлорофиллином и хлорином  $e_6$ , и, подобно другим авторам и производителям реактивов, называть оба вещества словом «хлорофиллин».

В литературе имеется много сообщений об угнетении хлорофиллином раковых клеток [27–31]. Поэтому проводимое в настоящей работе изучение влияния данного вещества на ростовые свойства клеточной линии A549 аденокарциномы лёгкого необходимо для адекватного планирования будущих работ по изучению действия хлорофиллина на клетки, подвергнутые влиянию других факторов, включая ионизирующее излучение.

Индралин – это эталонный классический радиопротектор [32, 33]. С ним сравнивают эффекты других радиозащитных веществ в различных исследованиях [6, 7, 34–37]. Поэтому в настоящей работе мы также изучили влияние индралина на ростовые свойства клеток линии A549.

Индралин сам по себе не растворяется в воде. Поэтому мы использовали его в виде смеси с винной кислотой в соотношении, близком к эквимольному. В подобном виде индралин используют в работах, предполагающих его введение в организм подопытным животным в виде инъекционной формы [7, 34].

Однако дополнительное (помимо индралина) наличие в культуральной среде винной кислоты затрудняет интерпретацию результатов эксперимента по изучению влияния индралина на ростовые свойства клеток аденокарциномы лёгкого. Поэтому мы также провели аналогичный эксперимент с раствором винной кислоты, в котором её концентрация соответствует таковой в смеси с индралином.

Данные измерения мы посчитали обязательными для проведения по причине имеющейся в литературе информации о том, что различные производные винной кислоты обладают противоопухолевой активностью [38–42]. А потому винная кислота может сама по себе угнетать рост клеток линии A549 в культуре.

## 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 следующих растворов: 4 мМ тролокс (Sigma-Aldrich, Merck, США), медный хлорофиллин (Macklin, Китай), 4 мМ рибоксин (ОАО «Дальхимфарм», Россия), 4 мМ винная кислота (Macklin, Китай) или смесь 3,79 мМ индралина (НПЦ «Фармзащита», Россия) и 4 мМ винной кислоты (Китай). В итоге концентрация данных веществ, за исключением индралина, в планшете составила 2 мМ, концентрация индралина – 1,9 мМ.

Далее планшет инкубировался в течение суток в  $CO_2$ -инкубаторе при 37 °С. 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). Данный флуорофор связывается с ДНК, поэтому по его флуоресценции можно оценивать содержание клеток в пробах [43, 44].

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 которой присутствовали окрашенные Hoechst-33342 клетки без внесения изучаемых веществ. Каждая проба выполнялась в 8 повторностях.

## *Изучение способности хлорофиллина различных концентраций подавлять адгезивные свойства клеток линии A549*

Эксперимент так же, как и предыдущий, проводился в 96-луночном планшете с использованием клеточной линии аденокарциномы лёгкого человека A549. В ячейки планшета мы вносили по 25 000 клеток в 100 мкл полной среды RPMI 1640 без внесения сыворотки. Далее планшет с клетками инкубировался в  $CO_2$ -инкубаторе при температуре 37 °С. После этого в пробы было внесено по 100 мкл растворов хлорофиллина так, чтобы итоговая концентрация хлорофиллина в пробах находилась в диапазоне 50–500 мкМ. В контрольные пробы было внесено 100 мкл среды. Далее пробы инкубировались при температуре 37 °С в течение 2,5 ч, после чего из лунок планшета было отобрано по 150 мкл среды и внесено по 50 мкл раствора флуоресцентного красителя Hoechst-33342 концентрацией 2 мкг/мл. После этого пробы инкубировались в течение 10 мин при температуре 37 °С, после чего из них было отобрано по 90 мкл среды и внесено по 190 мкл полной среды RPMI 1640 без бычьей сыворотки. Далее пробы инкубировались в течение часа при температуре 37 °С. После этого из проб было отобрано по 190 мкл среды и внесено по 50 мкл фосфатного буфера, приготовленного путём растворения таблеток PBS (Thermo Fisher Scientific, США) в деионизированной воде. Далее была зарегистрирована интенсивность флуоресценции проб на длине волны 460 нм при возбуждении проб светом с длиной волны 355 нм с использованием планшетного флуориметра FLUOstar Omega с установленным значением gain-factor, равным 1300. 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

На рис. 2 представлены средние значения интенсивности флуоресценции в образцах, в течение суток инкубированных в 2 мМ растворах тролокса, хлорофиллина, рибоксина, винной кислоты и смеси 1,9 мМ индралина и 2 мМ винной кислоты.

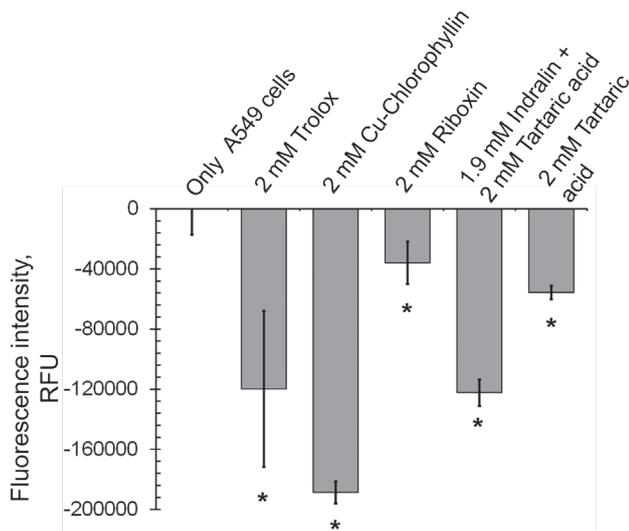


Рис. 2. Уменьшение интенсивности флуоресценции Hoechst-33342 (рабочая концентрация 1 мкг/мл (1,62 мкМ)) под действием тролокса, хлорофиллина, рибоксина, винной кислоты и смеси индралина и винной кислоты по сравнению с контрольной пробой после суточной инкубации – доказательство торможения роста клеток в культуре под действием данных веществ. \*статистически значимое ( $p = 95\%$ ) отличие от контроля (клетки без внесения указанных веществ), данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  предельная погрешность среднего

Fig. 2. Reduction of fluorescence intensity Hoechst-33342 (working concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (1.62  $\mu\text{M}$ )) under the action of trolox, chlorophyllin, riboxin, tartaric acid and a mixture of indralin and tartaric acid compared with the control sample after daily incubation – 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 are presented in the form of arithmetic mean  $\pm$  marginal error of the mean

Как видно из данных, представленных на рис. 2, все изучаемые вещества статистически значимо влияют на ростовые свойства культуры клеток в сторону их угнетения. При этом наибольшее угнетение оказывает медный хлорофиллин. Существенное угнетение наблюдается и под действием тролокса и индралина. Для последнего необходимо указать, что угнетение ростовых свойств A549 смесью индралина и винной кислоты статистически значимо превосходит таковое для чистой винной кислоты, хотя она также значимо уменьшает содержание клеток в пробе относительно контроля.

Хотя 2 мМ рибоксин также статистически значимо уменьшает содержание клеток в пробе, его влияние, по сравнению с другими изучаемыми веществами, минимально. Относительно небольшой эффект оказывает и чистая винная кислота.

### Изучение способности хлорофиллина различных концентраций подавлять адгезивные свойства клеток линии A549

Так как медный хлорофиллин показал наиболее выраженное угнетение ростовых свойств клеток линии A549, мы провели также эксперимент по изучению влияния данного вещества на адгезивные свойства уже прикрепившихся ко дну лунок планшета клеток указанной линии, иными словами – по изучению способности хло-

рофиллина откреплять клетки, прикрепившиеся ко дну планшета. При этом мы использовали хлорофиллин в существенно меньших концентрациях, чем в основном эксперименте: вместо 2 мМ хлорофиллина – хлорофиллин в диапазоне концентраций 50–500 мкМ.

В описываемом дополнительном эксперименте с хлорофиллином изучалось не общее влияние данного вещества на ростовые свойства клеток линии A549 как совокупность адгезивных и пролиферативных их свойств, а именно его влияние на способность клеток оставаться прикрепленными к субстрату – дну лунок планшета. Для этого мы вносили хлорофиллин в лунки планшета не вместе с клетками, а только спустя 12 ч после внесения в них клеточной суспензии. За это время клетки аденокарциномы успевают полноценно прикрепиться к субстрату. А так как указанный опыт не предполагал того, что клетки должны активно делиться, мы использовали питательную среду без добавления сыворотки.

Клетки инкубировались в растворах хлорофиллина в течение 2,5 ч, после чего они были окрашены красителем Hoechst-33342. При замене среды при отмывке от не проникшего в клетки красителя и перед началом измерений на флуориметре клетки, под действием хлорофиллина открепившиеся от дна лунок планшета, забирались вместе со средой. Поэтому к моменту регистрации флуоресценции в лунках планшета оставались лишь клетки, по-прежнему прикрепленные к их дну. Поэтому на основании снижения интенсивности флуоресценции Hoechst-33342, светящегося при связывании с ДНК, можно говорить об угнетении хлорофиллином адгезивных свойств клеток в соответствующих пробах.

В роли референсной пробы в данном эксперименте, в отличие от основного, описываемого в настоящей статье, выступали неокрашенные Hoechst-33342 клетки. Это позволило оценивать то, какая доля клеток сохраняет адгезивные свойства после инкубации в растворах хлорофиллина.

В табл. 1 представлены данные об интенсивности флуоресценции Hoechst-33342 в пробах, предварительно инкубации в присутствии хлорофиллина различных концентраций.

Таблица 1

Интенсивность флуоресценции в канале ex355/em460 клеток линии A549, окрашенных Hoechst-33342, предварительно инкубированных в хлорофиллине различных концентраций. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  предельная погрешность среднего при доверительной вероятности 99 %

Fluorescence intensity in the ex 355/em460 channel of cells of the A549 line stained with Hoechst-33342, pre-incubated in chlorophyllin of various concentrations. The data is presented as an arithmetic mean  $\pm$  the marginal error of the mean with a confidence probability of 99 %

| Концентрация хлорофиллина, мкМ | Интенсивность флуоресценции в канале ex355/em460, о.е. |
|--------------------------------|--|
| 0                              | 56974 $\pm$ 3863                                       |
| 50                             | 43182 $\pm$ 5436                                       |
| 100                            | 31603 $\pm$ 6494                                       |
| 150                            | 27262 $\pm$ 6706                                       |
| 200                            | 19905 $\pm$ 6384                                       |
| 250                            | 18756 $\pm$ 4994                                       |
| 300                            | 15658 $\pm$ 4820                                       |
| 350                            | 14847 $\pm$ 2371                                       |
| 400                            | 10460 $\pm$ 1768                                       |
| 500                            | 7293 $\pm$ 2741  |

Из представленных в табл. 1 сведений следует, что хлорофиллин дозозависимо снижает число клеток в пробах. Для унификации полученных данных мы провели их обработку, заключающуюся в делении значений интенсивности флуоресценции Hoechst-33342 в пробах, инкубированных в хлорофиллине, на значение интенсивности флуоресценции Hoechst-33342 в контрольной пробе, не подвергнутой влиянию хлорофиллина. Таким образом мы получили примерную зависимость доли клеток, сохраняющих способность удерживаться на дне планшета, от концентрации раствора хлорофиллина, в котором данные клетки предварительно были проинкубированы.

Зависимость относительной интенсивности флуоресценции Hoechst-33342 от концентрации хлорофиллина в пробах, инкубированных в растворах хлорофиллина различных концентраций, по отношению к её уровню в контрольной, не подверженной влиянию хлорофиллина, приведена на рис. 3.

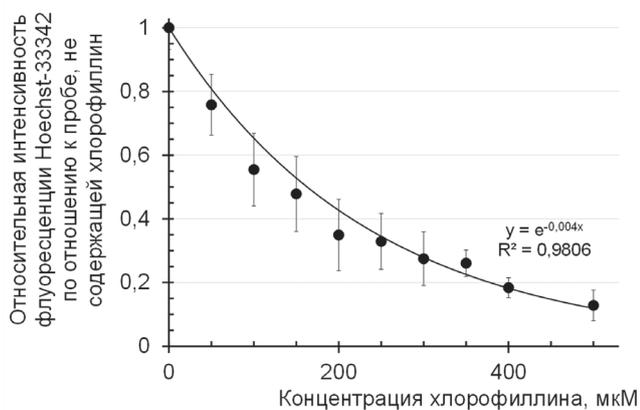


Рис. 3. Относительная интенсивность флуоресценции в канале ex355/em460 по отношению к пробе, не содержащей хлорофиллин, проб с клетками линии A549, окрашенных Hoechst-33342, предварительно инкубированных в хлорофиллине концентрацией до 500 мкМ.

$J_{rel}$  – отношение интенсивности флуоресценции в опытной пробе к интенсивности флуоресценции пробы, не содержащей хлорофиллин.  $C$  – концентрация хлорофиллина в среде, в которой предварительно были инкубированы клетки, мкМ.  $R^2$  – коэффициент достоверности аппроксимации,  $p = 0,99$

Fig. 3. The relative intensity of fluorescence in the ex 355/em460 channel in relation to the chlorophyllin-free sample of samples with cells of the A549 line stained with Hoechst-33342, pre-incubated in chlorophyllin concentration up to 500  $\mu$ M.  $J_{rel}$  – the ratio of the fluorescence intensity in the experimental sample to the fluorescence intensity of the sample that does not contain chlorophyllin.  $C$  – the concentration of chlorophyllin in the medium in which the cells were previously incubated,  $\mu$ M.  $R^2$  is the confidence coefficient of the approximation,  $p = 0.99$

На основании данных, представленных в таблице 1 и на рис. 3, можно говорить о том, что хлорофиллин уже в относительно небольших концентрациях, от 50 мкМ, угнетает способность клеток аденокарциномы лёгкого связываться с субстратом. При этом необходимо учитывать, что потеря способности клетками продолжать оставаться связанными с субстратом вызвана существенным угнетением их метаболизма и снижением жизнеспособности.

### Обсуждение результатов

Полученные в настоящей работе результаты касательно угнетения ростовых свойств клеток линии A549 под действием медного хлорофиллина, тролокса, рибоксина, винной кислоты и индралина вносят существенные коррективы в алгоритм проведения исследований с участием данных веществ при использовании куль-

тур клеток в качестве экспериментальных модельных систем. Так, некорректной становится схема эксперимента, предполагающая высевание клеток в планшеты со средой, содержащей изученные в настоящей работе препараты, и длительную инкубацию клеток с целью наращивания клеточной популяции в пробах с последующим влиянием на них каким-либо фактором и изучением различных свойств клеток без проверки количественного содержания клеток в пробах и/или их нормирования.

То есть при проведении экспериментов, предполагающих длительную предварительную инкубацию клеток в растворах изученных в настоящей работе веществ, необходимо учитывать то, что число клеток в данных пробах будет ниже такового в пробах, в которые указанные вещества не вносятся.

Угнетение ростовых свойств клеток линии A549 под действием рибоксина (инозина) по сравнению с клетками, инкубированными в чистой среде RPMI 1640, хотя и минимально, по сравнению с другими изученными в настоящей работе веществами, но всё же статистически значимо. Данный результат нас удивил в связи с тем, что рибоксин считается стимулятором клеточного метаболизма, приводящим к увеличению активности и жизнеспособности клеток, так как нуклеозиды являются естественными метаболитами, а общим их свойством является способность усиливать анаболические процессы по механизму субстратного регулирования, что приводит к интенсификации синтеза белка и нуклеиновых кислот и ускорению процессов репарации радиационных повреждений ДНК [45]. Хотя авторы [11] сообщают о цитостатическом действии производного рибоксина на линию опухолевых клеток.

Поэтому наш результат нельзя считать всё же в корне расходящимся с имеющимися в литературе представлениями. Можно предположить, что включение инозина в мРНК и тРНК может способствовать изменению протеома клеток [46], что теоретически может снизить их жизнеспособность, способность к пролиферации или адгезии на дне планшета.

Тролокс является классическим антиоксидантом. Согласно литературным данным, антиоксиданты способствуют пролиферации клеток [47–49]. Однако также имеются данные о том, что обладающие антиоксидантными свойствами индол-3-карбинол и ресвератрол являются антипролиферативными агентами для опухолевых клеток [50]. А сообщение авторов [17] о противоопухолевой активности конъюгатов тролокса с нитроксидами придаёт некую закономерность полученному нами результату.

Кроме того, имеются данные о том, что токоферол (тролокс – это растворимая в воде его форма) может угнетать некоторые формы рака [51, 52]. Однако в указанных исследованиях описанный эффект достигался при совместном использовании витамина E с другим веществом.

Здесь вполне можно упомянуть и наше собственное исследование [5], в ходе которого показан схожий с описываемым нами в настоящей работе эффект угнетения 2 мМ аскорбиновой кислотой ростовых свойств клеток линии A549.

Таким образом, влияние антиоксидантов на пролиферацию клеток не является однозначным. При этом, вполне возможно, что способность некоторых из них подавлять рост определенных клеток обусловлена не их именно антиоксидантными свойствами, а другими причинами.

Медный хлорофиллин показал наибольший эффект по угнетению ростовых свойств клеток аденокарцино-

мы лёгкого. При этом данное подавление обусловлено не только торможением пролиферации клеток, но и угнетением способности клеток к адгезии на дно лунки планшета. Последнее было доказано в ходе дополнительного эксперимента, в результате которого было показано, что хлорофиллин даже в концентрации 50 мкМ не только не даёт клеткам аденокарциномы лёгкого прикрепляться к субстрату, но и способствует отделению от него уже прикрепившихся клеток. И доля таких открепляющихся клеток увеличивается с ростом концентрации хлорофиллина.

Если обращаться к литературе, то сведения относительно влияния хлорофиллина на рост раковых клеток носят противоречивый характер. Большое число исследователей сообщает об угнетении раковых клеток под действием хлорофиллина [27–31]. Однако авторы [53] показали, что хлорофиллин защищает клетки от цитостатического и цитотоксического действия хинакринового иприта.

Прямо противоположные по смыслу сообщения в литературе и самое выраженное, относительно других изученных нами веществ, подавление хлорофиллином ростовых свойств клеток линии A549 делают данное вещество наиболее интересным для дальнейших исследований. Для понимания общей картины влияния хлорофиллина на ростовые свойства клеток в культуре необходимо проведение экспериментов на различных клеточных линиях.

В целом, полученные сведения о подавлении ростовых свойств клеток аденокарциномы лёгкого в культуре веществами, обладающими радиозащитным действием, кажется весьма интересным. И полученный результат приводит к мысли о том, что, вполне возможно, комбинированное применение данных веществ совместно с лучевой терапией онкологических заболеваний может повысить её эффективность.

Считаем необходимым заметить, что широко применяемый на Западе радиопротектор амифостин широко используется при лучевой терапии онкологических больных [54].

Если говорить о табельном отечественном радиопротекторе индралине, то эффект подавления ростовых свойств клеток линии A549 под действием его в смеси с винной кислотой значимо превосходит эффект самой винной кислоты. Это позволяет предположить, что индралин также угнетает ростовые свойства клеток в культуре.

Индралин является агонистом  $\alpha 1$ -адренорецепторов, именно это его свойство обеспечивает проявление им радиозащитного эффекта в следствие создания гипоксии в тканях по причине сужения кровеносных сосудов [32].

Достоверной информации касательно влияния веществ с подобными свойствами на ростовые свойства клеток в культуре нам найти не удалось. Однако известно, что агонисты  $\beta$ -адренорецепторов стимулируют процессы пролиферации и метастазирования в раке молоч-

ной железы, прямой кишки, предстательной и поджелудочной желёз и аденокарциноме лёгкого [55].

То есть, вещества из этих двух групп могут обладать противоположными свойствами. Однако здесь необходимо учитывать, что какие-либо эффекты при обработке культуры клеток тем или иным веществом могут кардинальным образом отличаться от эффектов при воздействии данного вещества на целый организм. Поэтому для окончательных выводов касательно влияния изученных нами веществ на рост клеток необходимо проведение обширных исследований на различных экспериментальных модельных системах.

А если говорить об исследованиях на культуре клеток, то здесь целесообразным мы считаем повторение проведённого нами в настоящей работе эксперимента с использованием других клеточных линий, причём среди них должна также быть и линия неопухолевых клеток, такие культуры часто называют диплоидными [56, 57]. В этом случае появится понимание того, на сколько универсальны описанные нами эффекты.

### Заключение

Таким образом, мы на основании флуоресценции красителя Hoechst-33342, светящегося при связывании с ДНК клеток, показали статистически значимое подавление ростовых свойств клеток аденокарциномы лёгкого человека линии A549 под действием 2 мМ растворов медного хлорофиллина, рибоксина, тролокса, винной кислоты и смеси 1,9 мМ индралина и 2 мМ винной кислоты по сравнению к ростом клеток, не подвергнутых влиянию данных веществ. Причём эффект от смеси индралина и винной кислоты статистически значимо сильнее, чем от действия одной винной кислоты.

Влияние тролокса, в целом, схоже с влиянием смеси индралина и винной кислоты. Влияние самой винной кислоты немногим выше, чем у рибоксина, показавшего наименьший, хотя и статистически значимый, эффект подавления ростовых свойств клеток A549.

Показанный нами эффект может быть обусловлен как непосредственно угнетением изучаемыми препаратами пролиферации клеток, так и подавлением ими адгезии клеток к дну планшета. При этом, скорее всего, свой вклад в полученный нами результат внесли оба этих фактора.

Наибольший эффект в нашем исследовании продемонстрировал 2 мМ хлорофиллин. Поэтому с данным веществом мы провели дополнительный эксперимент, в результате которого мы показали, что данное вещество дозозависимо угнетает адгезивные свойства уже прикрепившихся клеток линии A549. При этом данный эффект статистически значимо проявлял хлорофиллин даже в концентрации 50 мкМ.

Результаты настоящей работы необходимо учитывать при планировании экспериментов с участием изученных нами веществ на модели культур клеток.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Lei G., Zhang Y., Koppula P., Liu X., Zhang J., Lin S.H., Ajani J.A., Xiao Q., Liao Z., Wang H., Gan B. The Role of Ferroptosis in Ionizing Radiation-Induced Cell Death and Tumor Suppression // *Cell Research*. 2020. Vol.30. P.146–162. doi: 10.1038/s41422-019-0263-3.
2. Raitanen J., Barta B., Hacker M., Georg D., Balber T., Mitterhauser M. Comparison of Radiation Response between 2D and 3D Cell Culture Models of Different Human Cancer Cell Lines // *Cells*. 2023. Vol.12. No.3. P.360. doi: 10.3390/cells12030360.
3. Jooyan N., Mortazavi S.M.J., Goliaei B., Faraji-Dana R. Indirect Effects of Interference of Two Emerging Environmental Contaminants on Cell Health: Radiofrequency Radiation and Gold Nanoparticles // *Chemosphere*. 2024. Vol.349. P.140942. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.140942.
4. Pustovalova M., Astrelina capital Te C., Grekhova A., Vorobyeva N., Tsvetkova A., Blokhina T., Nikitina V., Suchkova Y., Usupzhanova D., Brunchukov V., Kobzeva I., Karaseva capital Te C., Ozerov I.V., Samoylov A., Bushmanov A., Leonov S., Izumchenko E., Zhavoronkov A., Klokov D., Osipov A.N. Residual GammaH2AX Foci Induced by Low Dose X-Ray Radiation in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Do Not Cause Accelerated Senescence in the Progeny of Irradiated Cells // *Aging*. 2017. Vol.9. No.11. P.2397–2410. doi: 10.18632/aging.101327.
5. 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 радиобиология и радиационная безопасность*. 2024. Т.69. №1. С.28–32. doi: 10.33266/1024-6177-2024-69-1-28-32.

6. Сычёва Л.П., Рождественский Л.М., Лисина Н.И., Шлякова Т.Г., Зорин В.В. Антимутагенная активность и гепатопротекторное действие противолучевых препаратов // Медицинская генетика. 2020. Т.19. №9(218). С.81–82. doi: 10.25557/2073-7998.2020.09.81-82.
7. Сычёва Л.П., Лисина Н.И., Щеголева Р.А., Рождественский Л.М. Антимутагенное действие противолучевых препаратов в эксперименте на мышах // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т.59. №4. С.88–393. doi: 10.1134/S086980311904012X.
8. Гудков С.В., Гудкова О.Ю., Штаркман И.Н., Гапеев А.Б., Чемерис Н.К., Брусов В.И. Гуанозин и инозин как природные генопротекторы для клеток крови мышей при воздействии рентгеновского излучения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т.46. №6. С.713–718.
9. Попова Н.Р., Гудков С.В., Брусов В.И. Природные пуриновые соединения как радиозащитные средства // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т.54. №1. С.38–49. doi: 10.12698/S0869803114010135.
10. Hou B., Xu Z.W., Yang C.W., Gao Y., Zhao S.F., Zhang C.G. Protective Effects of Inosine on Mice Subjected to Lethal Total-Body Ionizing Irradiation // Journal of Radiation Research. 2007. Vol.48. No.1. P.57–62. doi: 10.1269/jrr.06067.
11. Blanco J.M., Caamano O., Fernandez F., Rodriguez-Borges J.E., Balzarini J., de Clercq E. Carbocyclic Analogues of Nucleosides from bis-(Hydroxymethyl)-Cyclopentane: Synthesis, Antiviral and Cytostatic Activities of Adenosine, Inosine and Uridine Analogues // Chemical & pharmaceutical bulletin. 2003. Vol.51. No.9. P.1060–1063. doi: 10.1248/cpb.51.1060.
12. Зерный Е.Ю., Головастова М.О., Бакшеева В.Е., Кабанова Е.И., Ишутина И.Е., Ганчарова О.С., Гусев А.Е., Савченко М.С., Лобода А.П., Сотникова Л.Ф., Замятин А.А., Филиппов П.П., Сенин И.И. Изменения биохимических свойств слезной жидкости при развитии хронической формы синдрома сухого глаза в посленаркозный период // Биохимия. 2017. Т.82. №1. С.137–148.
13. McClain D.E., Kalinich J.F., Ramakrishnan N. Trolox Inhibits Apoptosis in Irradiated MOLT-4 Lymphocytes // FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1995. Vol.9. No.13. P.1345–1354. doi: 10.1096/fasebj.9.13.7557025.
14. Jiang S.J., Xiao X., Li J., Mu Y. Lycium Barbarum Polysaccharide-Glycoprotein Ameliorates Ionizing Radiation-Induced Epithelial Injury by Regulating Oxidative Stress and Ferroptosis Via the Nrf2 Pathway // Free Radical Biology & Medicine. 2023. Vol.204. P.84–94. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.04.020.
15. Sangsuwan T., Pour Khavari A., Blomberg E., Romell T., Godoy P., Harms-Ringdahl M., Haghdoust S. Oxidative Stress Levels and DNA Repair Kinetics in Senescent Primary Human Fibroblasts Exposed to Chronic Low Dose Rate of Ionizing Radiation // Frontiers in Bioscience. 2023. Vol.28. No.11. P.296. doi: 10.31083/fj.bl2811296.
16. Ding S.S., Sun P., Zhang Z., Liu X., Tian H., Huo Y.W., Wang L.R., Han Y., Xing J.P. Moderate Dose of Trolox Preventing the Deleterious Effects of Wi-Fi Radiation on Spermatozoa *In vitro* through Reduction of Oxidative Stress Damage // Chinese Medical Journal. 2018. Vol.131. No.4. P.402–412. doi: 10.4103/0366-6999.225045.
17. Zakharova O.D., Frolova T.S., Yushkova Y.V., Chernyak E.I., Pokrovskiy A.G., Pokrovskiy M.A., Morozov S.V., Sinitsina O.I., Grigor'ev I.A., Nevinskiy G.A. Antioxidant and Antitumor Activity of Trolox, Trolox Succinate, and Alpha-Tocopherol Succinate Conjugates with Nitroxides // European Journal of Medicinal Chemistry. 2016. Vol.122. P.127–137. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.05.051.
18. Поздеев А.В., Лысенко Н.П. Повышение радиационной устойчивости организма млекопитающих при применении препаратов хлорофилла в условиях радиоактивного загрязнения окружающей среды // Известия Международной академии аграрного образования. 2018. Выпуск 42. Т.2. С.60–62.
19. Поздеев А.В., Гугало В.П. Влияние препарата хлорофилла на содержание малового диальдегида при радиационной патологии // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2012. №2. С.107–109.
20. Kumar S.S., Shankar B., Sainis K.B. Effect of Chlorophyllin against Oxidative Stress in Splenic Lymphocytes *in vitro* and *in vivo* // Biochimica et Biophysica Acta. 2004. Vol.1672. No.2. P.100–111. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.03.002.
21. Geric M., Gajski G., Mihaljevic B., Miljanic S., Domijan A.M., Garaj-Vrhovac V. Radioprotective Properties of Food Colorant Sodium Copper Chlorophyllin on Human Peripheral Blood Cells *in vitro* // Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2019. Vol.845. P.403027. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.02.008.
22. Morales-Ramirez P., Mendiola-Cruz M.T. *In Vivo* Radioprotective Effect of Chlorophyllin on Sister Chromatid Exchange Induction in Murine Spermatogonial Cells // Mutation Research. 1995. Vol.344. No.1-2. P.73–78. doi: 10.1016/0165-1218(95)90041-1.
23. Morales-Ramirez P., Garcia-Rodriguez M.C. *In Vivo* Effect Of Chlorophyllin On Gamma-Ray-Induced Sister Chromatid Exchange in Murine Bone Marrow Cells // Mutation Research. 1994. Vol.320. No.4. P.329–334. doi: 10.1016/0165-1218(94)90085-x.
24. Abraham S.K., Sarma L., Kesavan P.C. Role of Chlorophyllin as an *in Vivo* Anticlastogen: Protection Against Gamma-Radiation and Chemical Clastogens // Mutation Research. 1994. Vol.322. No.3. P.209–212. doi: 10.1016/0165-1218(94)90008-6.
25. Zimmering S., Olvera O., Hernandez M.E., Cruces M.P., Arceo C., Pimental E. Evidence for a Radioprotective Effect of Chlorophyllin in *Drosophila* // Mutation Research. 1990. Vol.245. No.1. P.47–49. doi: 10.1016/0165-7992(90)90024-e.
26. Ромодин Л.А., Лысенко Н.П. Радиопротекторное действие препаратов на основе хлорофилла // Биофизика. 2022. Т.67. №1. С.96–104. doi: 10.31857/S0006302922010094.
27. Chiu L.C., Kong C.K., Ooi V.E. The Chlorophyllin-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells is Associated with ERK Deactivation and Cyclin D1 Depletion // International Journal of Molecular Medicine. 2005. Vol.16. No.4. P.735–740.
28. Chimpoly K., Diaz G.D., Li Q., Carter O., Dashwood W.M., Mathews C.K., Williams D.E., Bailey G.S., Dashwood R.H. E2F4 and Ribonucleotide Reductase Mediate S-phase Arrest in Colon Cancer Cells Treated with Chlorophyllin // International Journal of Cancer. 2009. Vol.125. No.9. P.2086–2094. doi: 10.1002/ijc.24559.
29. Thiagarajan P., Kavitha K., Thautam A., Dixit M., Nagini S. Dietary Chlorophyllin Abrogates TGFbeta Signaling to Modulate the Hallmark Capabilities of Cancer in an Animal Model of Forestomach Carcinogenesis // Tumour Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2014. Vol.35. No.7. P.6725–6737. doi: 10.1007/s13277-014-1849-5.
30. Das J., Samadder A., Mondal J., Abraham S.K., Khuda-Bukhsh A.R. Nano-Encapsulated Chlorophyllin Significantly Delays Progression OF Lung Cancer both in *in vitro* and *in vivo* Models through Activation of Mitochondrial Signaling Cascades and Drug-DNA Interaction // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2016. Vol.46. P.147–157. doi: 10.1016/j.etap.2016.07.006.
31. Sun S., Zhang Y., Xu W., Yang R., Guo J., Guan S., Ma Q., Ma K., Xu J. Chlorophyllin Inhibits Mammalian Thioredoxin Reductase 1 and Triggers Cancer Cell Death // Antioxidants. 2021. Vol.10. No.11. P.1733. doi: 10.3390/antiox10111733.
32. Ильин Л.А., Рудный Н.М., Суворов Н.Н., Чернов Г.А., Антилов В.В., Васин М.В., Давыдов Б.И., Михайлов П.П. Индралин – радиопротектор экстренного действия. Противолучевые свойства, фармакология, механизм действия, клиника. Москва: Вторая типография Министерства здравоохранения Российской Федерации, 1994. 436 с.
33. Васин М.В. Препарат Б-190 (индралин) в свете истории формирования представлений о механизме действия радиопротекторов // Радиационная биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. №4. С.378–395. doi: 10.31857/S0869803120040128.
34. Ромодин Л.А., Никитенко О.В., Бычкова Т.М., Зрилова Ю.А., Родионова Е.Д., Бочаров Д.А. Радиопротекторные свойства рибоксина (инозина) и индралина при внешнем облучении // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023. Т.176. №11. С.585–588. doi: 10.47056/0365-9615-2023-176-11-585-588.
35. Легеза В.И., Гребенюк А.Н., Заргарова Н.И. К вопросу об эффективности применения радиопротекторов различного механизма действия при поражениях, типичных для радиационных аварий (экспериментальное исследование) // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2013. №1. С.42–47.
36. Гребенюк А.Н., Мясников В.А., Зацепин В.В., Аксенова Н.В., Быков В.Н., Сидоров Д.А. Сравнительное изучение эффективности гепарина, интерлейкина-1β, β-эстрадиола и индометона в качестве радиопротекторов при остром облучении // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2011. Т.4(36). С.101–104.
37. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Макачук В.М., Чеснакова Е.А., Измestьева О.С., Корнеева Т.С., Филимонов А.С. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтазы T1023: I. Показатели противолучевой активности и взаимодействие с другими радиопротекторами // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т.55. №3. С.250–259. doi: 10.7868/S0869803115030042.
38. Zhang Y., Huang Q., Xu Q., Jia C., Xia Y. Pimavanserin Tartrate Induces Apoptosis and Cytoprotective Autophagy and Synergizes with Chemotherapy on Triple Negative Breast Cancer // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2023. Vol.168. P.115665. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115665.
39. Lecureur V., Le Thiec A., Le Meur A., Amiot L., Drenou B., Bernard M., Lamy T., Fauchet R., Fardel O. Potassium Antimonyl Tartrate Induces Caspase- and Reactive Oxygen Species-Dependent Apoptosis in Lymphoid Tumoral Cells // British Journal of Haematology. 2002. Vol.119. No.3. P.608–615. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03863.x.
40. Lecureur V., Lagadic-Gossmann D., Fardel O. Potassium Antimonyl Tartrate Induces Reactive Oxygen Species-Related Apoptosis in Human Myeloid Leukemic HL60 Cells // International Journal of Oncology. 2002. Vol.20. No.5. P.1071–1076.
41. Chang S.H., Lee A.Y., Yu K.N., Park J., Kim K.P., Cho M.H. Dihydroergotamine Tartrate Induces Lung Cancer Cell Death through Apoptosis and Mitophagy // Chemotherapy. 2016. Vol.61. No.6. P.304–312. doi: 10.1159/000445044.
42. Elmetswalli A., Hashish S.M., Hassan M.G., El-Magd M.A., El-Naggar S.A., Tolba A.M., Salama A.F. Modulation of the Oxidative Damage, Inflammation, and Apoptosis-Related Genes by Dicinnamoyl-L-tartaric Acid in Liver Cancer // Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2023. Vol.396. No.11. P.3087–3099. doi: 10.1007/s00210-023-02511-8.
43. 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. Vol.12. No.20. P.e2300230. doi: 10.1002/adhm.202300230.
44. Cordeiro M.M., Filipe H.A.L., Santos P.D., Samelo J., Ramalho J.P.P., Loure L.M.S., Moreno M.J. Interaction of Hoechst 33342 with POPC Membranes at Different pH Values // Molecules. 2023. Vol.28. No.15. P.5640. doi: 10.3390/molecules28155640.
45. Васин М.В., Ушаков И.Б. Потенциальные пути повышения устойчивости организма к поражающему действию ионизирующего излучения с помощью радиомитигаторов // Успехи современной биологии. 2019. Т.139. №3. С.235–253. doi: 10.1134/S0042132419030098.
46. Srinivasan S., Torres A.G., Ribas de Pouplana L. Inosine in Biology and Disease // Genes. 2021. Vol.12. No.4. P.600. doi: 10.3390/genes12040600.
47. Журавлёв А.И., Зубкова С.М. Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология, старение. Второе издание, исправленное и дополненное. М.: Белые альфы, 2014. 304 с.
48. Журавлёв А.И. Квантовая биофизика животных и человека: свечение живых тканей. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. 400 с.
49. Hutchison J.C., Evans J., Edgell T.A., Nie G., Gardner D.K., Salamonsen L.A. Detrimental Actions of Obesity-Associated Advanced Glycation End-Products on Endometrial Epithelial Cell Proliferation are Alleviated by Antioxidants // Reproductive Biomedicine Online. 2023. Vol.47. No.1. P.35–50. doi: 10.1016/j.rbmo.2023.01.021.
50. Raj M.H., Abd Elmaged Z.Y., Zhou J., Gaur R.L., Nguyen L., Azam G.A., Bralley P., Rao P.N., Fathi I.M., Ouhit A. Synergistic Action of Dietary Phyto-Antioxidants on Survival and Proliferation of Ovarian Cancer Cells // Gynecologic Oncology. 2008. Vol.110. No.3. P.432–438. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.05.001.
51. Asay S., Graham A., Hollingsworth S., Barnes B., Oblad R.V., Michaelis D.J., Kenealey J.D. Gamma-Tocotrienol and Alpha-Tocopherol Ether Acetate Enhance Docetaxel Activity in Drug-Resistant Prostate Cancer Cells // Molecules. 2020. Vol.25. No.2. P.398. doi: 10.3390/molecules25020398.

52. Liu K.Y., Wang Q., Nakatsu C.H., Jones-Hall Y., Jiang Q. Combining Gamma-Tocopherol and Aspirin Synergistically Suppresses Colitis-Associated Colon Tumorigenesis and Modulates the Gut Microbiota in Mice, and Inhibits the Growth of Human Colon Cancer Cells // *European Journal of Pharmacology*. 2023. Vol.946. P.175656. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175656.
53. Ardelt B., Kunicki J., Traganos F., Darzynkiewicz Z. Chlorophyllin Protects Cells from the Cytostatic and Cytotoxic Effects of Quinacrine Mustard but Not of Nitrogen Mustard // *International Journal of Oncology*. 2001. Vol.18. No.4. P.849–853. doi: 10.3892/ijco.18.4.849.
54. Kouvaris J.R., Kouloulis V.E., Vlahos L.J. Amifostine: the First Selective-Target and Broad-Spectrum Radioprotector // *The Oncologist*. 2007. Vol.12. No.6. P.738–747. doi: 10.1634/theoncologist.12-6-738.
55. Бузган Н.Г., Семенов О.Ф., Доросевич А.Е. Влияние холино-адренергетиков на становление и развитие немелкоклеточного рака лёгкого // *Вопросы онкологии*. 2016. Т.62. №5. С.694–700.
56. Фатюхина О.Е., Колокольцова Т.Д., Трошкова Г.П. Оценка безопасности метода лазерно-индуцированной флюоресценции на модели культуры диплоидных клеток человека // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2007. Т.4. С.203–206.
57. Пováляева О.С., Чадаева А.А., Луницин А.В., Юрков С.Г. Штаммы диплоидных клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus* и их перmissивность к орбивирусам (*Reoviridae: Orbivirus*) – возбудителям трансмиссивных болезней животных // *Вопросы вирусологии*. 2022. Т.67. №3. С.227–236. doi: 10.36233/0507-4088-114.

## REFERENCES

1. Lei G., Zhang Y., Koppula P., Liu X., Zhang J., Lin S.H., Ajani J.A., Xiao Q., Liao Z., Wang H., Gan B. The Role of Ferroptosis in Ionizing Radiation-Induced Cell Death and Tumor Suppression. *Cell Research*. 2020;30:146–162. doi: 10.1038/s41422-019-0263-3.
2. Raitanen J., Barta B., Hacker M., Georg D., Balber T., Mitterhauser M. Comparison of Radiation Response between 2D and 3D Cell Culture Models of Different Human Cancer Cell Lines. *Cells*. 2023;12:3:360. doi: 10.3390/cells12030360.
3. Jooyan N., Mortazavi S.M.J., Goliaei B., Faraji-Dana R. Indirect Effects of Interference of Two Emerging Environmental Contaminants on Cell Health: Radiofrequency Radiation and Gold Nanoparticles. *Chemosphere*. 2024;349:140942. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.140942.
4. Pustovalova M., Astrelina capital Te C., Grekhova A., Vorobyeva N., Tsvetkova A., Blokhina T., Nikitina V., Suchkova Y., Usupzhanova D., Brunchukov V., Kobzeva I., Karaseva capital Te C., Ozerov I.V., Samoylov A., Bushmanov A., Leonov S., Izumchenko E., Zhavoronkov A., Klokov D., Osipov A.N. Residual GammaH2AX Foci Induced by Low Dose X-Ray Radiation in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Do Not Cause Accelerated Senescence in the Progeny of Irradiated Cells. *Aging*. 2017;9:11:2397–2410. doi: 10.18632/aging.101327.
5. Romodin L.A., Yashkina E.L., Moskovskiy A.A. 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 Russ.). doi: 10.33266/1024-6177-2024-69-1-28-32.
6. Sycheva L.P., Rozhdvestvskiy L.M., Lisina N.I., Shlyakova T.G., Zorin V.V. Antimutagenic Activity and Hepatoprotective Effect of Anti-Radiation Drugs. *Medical Genetics*. 2020;19:9(218):81–82 (In Russ.). doi: 10.25557/2073-7998.2020.09.81-82.
7. Sycheva L.P., Lisina N.I., Shchegoleva R.A., Rozhdvestvskiy L.M. Antimutagenic Effect of Anti-Radiation Drugs in an Experiment on Mice. *Radiacionnaya Biologiya. Radioekologiya*. 2019;59:4:388–393. (In Russ.). doi: 10.1134/S086980311904012X.
8. Gudkov S.V., Gudkova O.Yu., Shtarkman I.N., Gapeev A.B., Chemeris N.K., Bruskov V.I. Guanosine and Inosine as Natural Geneprotectors for Mice Blood Cells Expo Sed to X-rays. *Radiacionnaya Biologiya. Radioekologiya*. 2006;46:6:713–718 (In Russ.).
9. Popova N.R., Gudkov S.V., Bruskov V.I. Natural Purine Compounds as Radioprotective Agents. *Radiacionnaya Biologiya. Radioekologiya*. 2014;54:1:38–49 (In Russ.). doi: 10.7868/S0869803114010135.
10. Hou B., Xu Z.W., Yang C.W., Gao Y., Zhao S.F., Zhang C.G. Protective Effects of Inosine on Mice Subjected to Lethal Total-Body Ionizing Irradiation. *Journal of Radiation Research*. 2007;48:1:57–62. doi: 10.1269/jrr.06067.
11. Blanco J.M., Caamano O., Fernandez F., Rodriguez-Borges J.E., Balzarini J., de Clercq E. Carbocyclic Analogues of Nucleosides from bis-(Hydroxymethyl)-Cyclopentane: Synthesis, Antiviral and Cytostatic Activities of Adenosine, Inosine and Uridine Analogues. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2003;51:9:1060–1063. doi: 10.1248/cpb.51.1060.
12. Zerniy E.Yu., Golovastova M.O., Baksheeva V.E., Kabanova E.I., Ishitina I.E., Gancharova O.S., Gusev A.E., Savchenko M.S., Loboda A.P., Sotnikova L.F., Zamyatina A.A., Philippov P.P., Senin I.I. Alterations in Tear Biochemistry Associated with Chronic Dry Eye Syndrome in Postanesthetic Period. *Biohimiya*. 2017;82:1:137–148. (In Russ.).
13. McClain D.E., Kalinich J.F., Ramakrishnan N. Trolox Inhibits Apoptosis in Irradiated MOLT-4 Lymphocytes. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9:13:1345–1354. doi: 10.1096/fasebj.9.13.7557025.
14. Jiang S.J., Xiao X., Li J., Mu Y. Lycium Barbarum Polysaccharide-Glycoprotein Ameliorates Ionizing Radiation-Induced Epithelial Injury by Regulating Oxidative Stress and Ferroptosis Via the Nrf2 Pathway. *Free Radical Biology & Medicine*. 2023;204:84–94. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.04.020.
15. Sangsuwan T., Pour Khavari A., Blomberg E., Romell T., Godoy P., Harms-Ringdahl M., Haghdoust S. Oxidative Stress Levels and DNA Repair Kinetics in Senescent Primary Human Fibroblasts Exposed to Chronic Low Dose Rate of Ionizing Radiation. *Frontiers in Bioscience*. 2023;28:11:296. doi: 10.31083/j.fbl2811296.
16. Ding S.S., Sun P., Zhang Z., Liu X., Tian H., Huo Y.W., Wang L.R., Han Y., Xing J.P. Moderate Dose of Trolox Preventing the Deleterious Effects of Wi-Fi Radiation on Spermatozoa *In vitro* through Reduction of Oxidative Stress Damage. *Chinese Medical Journal*. 2018;131:4:402–412. doi: 10.4103/0366-6999.225045.
17. Zakharova O.D., Frolova T.S., Yushkova Y.V., Chernykh E.I., Pokrovskiy A.G., Pokrovskiy M.A., Morozov S.V., Sinitina O.I., Grigor'ev I.A., Nevskiy G.A. Antioxidant and Antitumor Activity of Trolox, Trolox Succinate, and Alpha-Tocopheryl Succinate Conjugates with Nitroxides. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;122:127–137. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.05.051.
18. Pozdeev A.V., Lysenko N.P. Increasing the Radiation Resistance of the Mammalian Body when Using Chlorophyll Preparations in Conditions of Radioactive Environmental Pollution. *Izvestiya Mezhdunarodnoy Akademii Agrarnogo Obrazovaniya*. 2018;42:2:60–62 (In Russ.).
19. Pozdeev A.V., Gugalov V.P. The Effect of Chlorophyll Preparation on the Content of Malondialdehyde in Radiation Pathology. *Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy*. 2012;2:107–109 (In Russ.).
20. Kumar S.S., Shankar B., Sainis K.B. Effect of Chlorophyllin against Oxidative Stress in Splenic Lymphocytes *In vitro* and *In vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004;1672:2:100–111. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.03.002.
21. Geric M., Gajski G., Mihajljevic B., Miljanic S., Domijan A.M., Garaj-Vrhovac V. Radioprotective Properties of Food Colorant Sodium Copper Chlorophyllin on Human Peripheral Blood Cells *In vitro*. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019;845:403027. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.02.008.
22. Morales-Ramirez P., Mendiola-Cruz M.T. *In vivo* Radioprotective Effect of Chlorophyllin on Sister Chromatid Exchange Induction in Murine Spermatogonial Cells. *Mutation Research*. 1995;344:1-2:73–78. doi: 10.1016/0165-1218(95)90041-1.
23. Morales-Ramirez P., Garcia-Rodriguez M.C. *In vivo* Effect of Chlorophyllin On Gamma-Ray-Induced Sister Chromatid Exchange in Murine Bone Marrow Cells. *Mutation Research*. 1994;320:4:329–334. doi: 10.1016/0165-1218(94)90085-x.
24. Abraham S.K., Sarma L., Kesavan P.C. Role of Chlorophyllin as an *In Vivo* Anticlastogen: Protection Against Gamma-Radiation and Chemical Clastogens. *Mutation Research*. 1994. Vol. 322, № 3. – P: 209–212. doi: 10.1016/0165-1218(94)90008-6.
25. Zimmering S., Olvera O., Hernandez M.E., Cruces M.P., Arceo C., Pimental E. Evidence for a Radioprotective Effect of Chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutation Research*. 1990;245:1:47–49. doi: 10.1016/0165-7992(90)90024-e.
26. Romodin L.A., Lysenko N.P. The Radioprotective Effect of Chlorophyllin-Based Drugs. *Biophysics*. 2022;67:1:78–84. doi: 10.1134/S0006350922010158.
27. Chiu L.C., Kong C.K., Ooi V.E. The Chlorophyllin-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells is Associated with ERK Deactivation and Cyclin D1 Depletion. *International Journal of Molecular Medicine*. 2005;16:4:735–740.
28. Chimploy K., Diaz G.D., Li Q., Carter O., Dashwood W.M., Mathews C.K., Williams D.E., Bailey G.S., Dashwood R.H. E2F4 and Ribonucleotide Reductase Mediate S-phase Arrest in Colon Cancer Cells Treated with Chlorophyllin. *International Journal of Cancer*. 2009;125:9:2086–2094. doi: 10.1002/ijc.24559.
29. Thiagarajan P., Kavitha K., Thautam A., Dixit M., Nagini S. Dietary Chlorophyllin Abrogates TGFbeta Signaling to Modulate the Hallmark Capabilities of Cancer in an Animal Model of Forestomach Carcinogenesis. *Tumour Biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35:7:6725–6737. doi: 10.1007/s13277-014-1849-5.
30. Das J., Samadder A., Mondal J., Abraham S.K., Khuda-Bukhsh A.R. Nano-Encapsulated Chlorophyllin Significantly Delays Progression Of Lung Cancer both *In vitro* and *In vivo* Models through Activation of Mitochondrial Signaling Cascades and Drug-DNA Interaction. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016;46:147–157. doi: 10.1016/j.etap.2016.07.006.
31. Sun S., Zhang Y., Xu W., Yang R., Guo J., Guan S., Ma Q., Ma K., Xu J. Chlorophyllin Inhibits Mammalian Thioredoxin Reductase 1 and Triggers Cancer Cell Death. *Antioxidants*. 2021;10:11:1733. doi: 10.3390/antiox10111733.
32. Il'in L.A., Rudnyy N.M., Suvorov N.N., Chernov G.A., Antipov V.V., Vasin M.V., Davydov B.I., Mikhaylov P.P. *Indralin – Radioprotector Ekstrennogo Deystviya. Protivokhlevnyye Svoystva, Farmakologiya, Mekhanizm Deystviya, Klinika = Indralin is a Emergency Radioprotector. Anti-Radiation Properties, Pharmacology, Mechanism of Action, Clinic*. Moscow Publ., 1994. 436 p. (In Russ.).
33. Vasin M.V. B-190 (Indralin) in the Light of History of Formation of Ideas of the Mechanism of Action of Radioprotectors. *Radiacionnaya Biologiya. Radioekologiya*. 2020;60:4:378–395 (In Russ.). doi: 10.31857/S0869803120040128.
34. Romodin L.A., Nikitenko O.V., Bychkova T.M., Zrilova Yu.A., Rodionova E.D., Bocharov D.A. Radioprotective Properties of Riboxin (Inosine) and Indralin under External Irradiation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;176:11:585–588 (In Russ.). doi: 10.47056/0365-9615-2023-176-11-585-588.
35. Legeza V.I., Grebenyuk A.N., Zargarova N.I. To a Question on Efficiency of Application of Radioprotectors with Various Mechanisms of Action in Injures Typical for Radiation Accidents (Experimental Research). *Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations*. 2013;1:42–47 (In Russ.).
36. Grebenyuk A.N., Myasnikov V.A., Zatselin V.V., Aksenova N.V., Bykov V.N., Sidorov D.A. Comparative Study of the Effectiveness of Heparin, Interleukin-1β, B-Estradiol and Indometofen as Radioprotectors in Acute Irradiation. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2011;4(36):101–104 (In Russ.).
37. Filimonova M.V., Shevchenko L.I., Makarchuk V.M., Chesnakova E.A., Izmet'eva O.S., Korneeva T.S., Filimonov A.S. Radioprotective Properties of NO-Synthase Inhibitor T1023: I. Indicators of Radioprotective Activity and Interaction with Other Radioprotectors. *Radiacionnaya Biologiya. Radioekologiya*. 2015;55:3:250–259 (In Russ.). doi: 10.7868/S0869803115030042.
38. Zhang Y., Huang Q., Xu Q., Jia C., Xia Y. Pimavanserin Tartrate Induces Apoptosis and Cytoprotective Autophagy and Synergizes with Chemotherapy on Triple Negative Breast Cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;168:115665. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115665.
39. Lecreur V., Le Thiec A., Le Meur A., Amiot L., Drenou B., Bernard M., Lamy T., Faucher R., Fardel O. Potassium Antimonyl Tartrate Induces Caspase- and Reactive Oxygen Species-Dependent Apoptosis in Lymphoid Tumor Cells.

- British Journal of Haematology. 2002;119:3:608–615. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03863.x.
40. Lecreur V., Lagadic-Gossman D., Fardel O. Potassium Antimonyl Tartrate Induces Reactive Oxygen Species-Related Apoptosis in Human Myeloid Leukemic HL60 Cells. *International Journal of Oncology*. 2002;20:5:1071–1076.
41. Chang S.H., Lee A.Y., Yu K.N., Park J., Kim K.P., Cho M.H. Dihydroergotamine Tartrate Induces Lung Cancer Cell Death through Apoptosis and Mitophagy. *Chemotherapy*. 2016;61:6:304–312. doi: 10.1159/000445044.
42. Elmetwalli A., Hashish S.M., Hassan M.G., El-Magd M.A., El-Naggar S.A., Tolba A.M., Salama A.F. Modulation of the Oxidative Damage, Inflammation, and Apoptosis-Related Genes by Dicinnamoyl-L-tartaric Acid in Liver Cancer. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2023;396:11:3087–3099. doi: 10.1007/s00210-023-02511-8.
43. 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.
44. 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;28:15:5640. doi: 10.3390/molecules28155640.
45. Vasin M.V., Ushakov I.B. Potential Ways of Increase in Bogy Resistance to Damaging Action of Ionizing Radiation with the Aids of Radiomitigators. *Uspekhi Sovremennoy Biologii*. 2019;139:3:235–253 (In Russ.). doi: 10.1134/S0042132419030098.
46. Srinivasan S., Torres A.G., Ribas de Pouplana L. Inosine in Biology and Disease. *Genes*. 2021;12:4:600. doi: 10.3390/genes12040600.
47. Zhuravlyov A.I., Zubkova S.M. Antioxidanty. *Svobodnoradikal'naya Patologiya, Starenie* = Antioxidants. Free Radical Pathology, Aging. Second edition, revised and expanded. Moscow, Belye Al'vy Publ., 2014. 304 p. (In Russ.).
48. Zhuravlyov A.I. *Kvantovaya Biofizika Zhivotnykh I Cheloveka: Svechenie Zhivyykh Tkanyey* = Quantum Biophysics of Animals and Humans: The Glow of Living Tissues. Moscow, BINOM. Laboratoriya Znaniy Publ., 2014. 400 p. (In Russ.).
49. Hutchison J.C., Evans J., Edgell T.A., Nie G., Gardner D.K., Salamonsen L.A. Detrimental Actions of Obesity-Associated Advanced Glycation End-Products on Endometrial Epithelial Cell Proliferation are Alleviated by Antioxidants. *Reproductive Biomedicine Online*. 2023;47:1:35–50. doi: 10.1016/j.rbmo.2023.01.021.
50. Raj M.H., Abd Elmageed Z.Y., Zhou J., Gaur R.L., Nguyen L., Azam G.A., Braley P., Rao P.N., Fathi I.M., Ouhit A. Synergistic Action of Dietary Phyto-Antioxidants on Survival and Proliferation of Ovarian Cancer Cells. *Gynecological Oncology*. 2008;110:3:432–438. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.05.001.
51. Asay S., Graham A., Hollingsworth S., Barnes B., Oblad R.V., Michaelis D.J., Kenealey J.D. Gamma-Tocotrienol and Alpha-Tocopherol Ether Acetate Enhance Docetaxel Activity in Drug-Resistant Prostate Cancer Cells. *Molecules*. 2020;25:2:398. doi: 10.3390/molecules25020398.
52. Liu K.Y., Wang Q., Nakatsu C.H., Jones-Hall Y., Jiang Q. Combining Gamma-Tocopherol and Aspirin Synergistically Suppresses Colitis-Associated Colon Tumorigenesis and Modulates the Gut Microbiota in Mice, and Inhibits the Growth of Human Colon Cancer Cells. *European Journal of Pharmacology*. 2023;946:175656. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175656.
53. Ardel B., Kunicki J., Traganos F., Darzynkiewicz Z. Chlorophyllin Protects Cells from the Cytostatic and Cytotoxic Effects of Quinacrine Mustard but Not of Nitrogen Mustard. *International Journal of Oncology*. 2001;18:4:849–853. doi: 10.3892/ijo.18.4.849.
54. Kouvaris J.R., Kouloulas V.E., Vlahos L.J. Amifostine: the First Selective-Target and Broad-Spectrum Radioprotector. *The Oncologist*. 2007;12:6:738–747. doi: 10.1634/theoncologist.12-6-738.
55. Buzgan N.G., Semenenko O.F., Dorosevich A.E. Influence of Acetylcholine and Adrenergic Receptors on Development and Progression of Non-Small Cell Lung Cancer. *Voprosy Onkologii*. 2016;62:5:694–700 (In Russ.).
56. Fatyukhina O.E., Kolokol'tsova T.D., Troshkova G.P. Safety Assessment of the Laser-Induced Fluorescence Method Based on a Human Diploid Cell Culture Model. *Kletochnyye Tekhnologii v Biologii i Meditsine*. 2007;4:203–206 (In Russ.).
57. Povolayaeva O.S., Chadaeva A.A., Lunitsin A.V., Yurkov S.G. Dwarf bat's (*Pipistrellus Pipistrellus*) Lung Diploid Cell Strains and their Permissivity to Orbiviruses (*Reoviridae: Orbivirus*) – Pathogens of Vector-Borne Animal Diseases. *Problems of Virology*. 2022;67:3:227–236 (In Russ.). doi: 10.36233/0507-4088-114.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>.

**Участие авторов.** Статья подготовлена с равным участием авторов.

**Поступила:** 20.01.2024. Принята к публикации: 27.02.2024.

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

**Financing.** The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>.

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

**Article received:** 20.01.2024. Accepted for publication: 27.02.2024.