

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-185-189>
УДК 57.021



Оригинальная статья / Research article

Изучение радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития при нейтронном и фотонном облучении опухолевых клеток

М. С. Третьякова^{1, 5}✉, А. Г. Дрозд¹, М. В. Белоусов^{1, 2}, К. С. Бразовский¹,
М. С. Ларькина^{1, 2}, С. В. Кривошеков², А. А. Артамонов⁴, И. А. Милойчикова^{1, 5},
А. В. Безмага¹, А. М. Большаков¹, Е. С. Сухих¹, Е. В. Плотников^{1, 3}✉✉

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), 634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2

³ НИИ психического здоровья. Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томский НИМЦ), 634014, Россия, г. Томск, ул. Алеутская, д. 4

⁴ ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН» (ГНЦ РФ – ИМБП РАН), 123007, Россия, г. Москва, Хорошёвское шоссе, д. 76 А

⁵ НИИ онкологии. Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томский НИМЦ), 634009, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, д. 5

✉ Контактное лицо: Третьякова Мария Сергеевна. E-mail: trremar@gmail.com

✉✉ Контактное лицо: Плотников Евгений Владимирович. E-mail: plotnikovev@tpu.ru

ORCID: М. С. Третьякова – <https://orcid.org/0000-0002-5040-931X>; А. Г. Дрозд – <https://orcid.org/0000-0003-0633-213X>;
М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>; К. С. Бразовский – <https://orcid.org/0000-0002-4779-9820>;
М. С. Ларькина – <https://orcid.org/0000-0003-1176-2441>; С. В. Кривошеков – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>;
А. А. Артамонов – <https://orcid.org/0000-0002-7543-9611>; И. А. Милойчикова – <https://orcid.org/0000-0001-7741-2810>;
А. В. Безмага – <https://orcid.org/0009-0006-5620-0820>; А. М. Большаков – <https://orcid.org/0000-0003-1663-9506>;
Е. С. Сухих – <https://orcid.org/0000-0001-8251-2138>; Е. В. Плотников – <https://orcid.org/0000-0002-4374-6422>.

Статья поступила: 07.02.2023

Статья принята в печать: 25.04.2023

Статья опубликована: 25.05.2023

Резюме

Введение. Радиорезистентность раковых клеток серьезная проблема при лучевой терапии опухолевых заболеваний. Радиосенсибилизирующие препараты делают злокачественные клетки более чувствительными к излучению и повышают эффективность лучевой терапии, однако их широкое клиническое применение ограничено существенными побочными эффектами. Разработка и изучение новых радиосенсибилизаторов представляется актуальной задачей современной фармакологии.

Цель. Целью данной работы было изучение эффективности аскорбата лития в качестве радиосенсибилизатора при воздействии фотонного и нейтронного излучения в широком диапазоне доз.

Материалы и методы. Оценка биологического действия выполнялась на опухолевой линии аденокарциномы рака предстательной железы РС-3. В качестве генераторов ионизирующего излучения использовался циклотрон для получения нейтронного потока и источник кобальт-60 для получения гамма-излучения.

Результаты и обсуждение. Доказано усиление цитотоксического эффекта при сочетанном применении разных видов ионизирующих излучений и аскорбата лития. Выявлена устойчивость линии рака предстательной железы к гамма-излучению в поглощенной дозе 0,5–3,0 Гр. Показано, что опухолевые клетки рака предстательной железы более чувствительны к воздействию исследуемого препарата в минимальных концентрациях в сочетании с нейтронным облучением в сравнении с гамма-излучением в одинаковой поглощенной дозе. Основным механизмом радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития заключается в локальной индукции окислительного стресса, синергетически усиливающего действие ионизирующего излучения.

Заключение. Сочетание аскорбата лития с нейтронным излучением приводит к более выраженному результирующему цитотоксическому эффекту. Повышение концентрации аскорбата лития приводило к нарастанию прооксидатного эффекта с усилением повреждающего действия на клетки.

Ключевые слова: аскорбат лития, радиосенсибилизация, рак простаты, клетки линии РС-3, гамма-излучение, нейтронное излучение, апоптоз

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. С. Третьякова, А. Г. Дрозд проводили культивирование опухолевых линий и исследование биологических свойств препарата на клетках. Е. В. Плотников осуществлял составление плана исследований, общее руководство и постановку задач, обсуждение результатов. М. В. Белоусов, К. С. Бразовский, М. С. Ларькина, С. В. Кривошеков проводили химический синтез, характеристику препарата и расчет доз. А. А. Артамонов, Е. С. Сухих выполнили расчеты и обработку результатов. И. А. Милойчикова, А. В. Безмага, А. М. Большаков выполняли эксперименты по облучению клеточных культур на циклотроне и источнике гамма-излучения. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Программа «Приоритет 2030» Томского политехнического университета.

Для цитирования: Третьякова М. С., Дрозд А. Г., Белоусов М. В., Бразовский К. С., Ларькина М. С., Кривошеков С. В., Артамонов А. А., Милойчикова И. А., Безмага А. В., Большаков А. М., Сухих Е. С., Плотников Е. В. Изучение радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития при нейтронном и фотонном облучении опухолевых клеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(2):185–189. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-185-189>

- © Третьякова М. С., Дрозд А. Г., Белоусов М. В., Бразовский К. С., Ларькина М. С., Кривошеков С. В., Артамонов А. А., Милойчикова И. А., Безмага А. В., Большаков А. М., Сухих Е. С., Плотников Е. В., 2023
© Tretyakova M. S., Drozd A. G., Belousov M. V., Brazovskiy K. S., Larkina M. S., Krivoshchekov S. V., Artamonov A. A., Miloichikova I. A., Bezmag A. V., Bolshakov A. M., Sukhikh E. S., Plotnikov E. V., 2023

Study of the Radiosensitizing Action of Lithium Ascorbate Under Neutron and Photon Irradiation of Tumor Cells

Maria S. Tretyakova^{1,5}✉, Anastasia G. Drozd¹, Mikhail Belousov^{1,2}, Konstantin V. Brazovskiy¹, Maria S. Larkina^{1,2}, Sergei V. Krivoshchekov², Anton A. Artamonov⁴, Irina A. Miloichikova⁵, Artur V. Bezmaga¹, Alexey M. Bolshakov¹, Evgenia S. Sukhikh¹, Evgenii V. Plotnikov^{1,3}✉✉✉

¹ National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russia

² Siberian State Medical University, SSMU, 2, Moscow tract, Tomsk, 634050, Russia

³ Mental Health Research Institute. Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 4, Aleutskaya str., Tomsk, 634014, Russia

⁴ State Scientific Center of the Russian Federation – Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, 76 A, Khoroshevskoe shosse, Moscow, 123007, Russia

⁵ Cancer Research Institute. Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 5, Kooperativny per., Tomsk, 634009, Russia

✉ Corresponding author: Maria S. Tretyakova. E-mail: trremar@gmail.com

✉✉✉ Corresponding author: Evgenii V. Plotnikov. E-mail: plotnikovev@tpu.ru

ORCID: Maria S. Tretyakova – <https://orcid.org/0000-0002-5040-931X>; Anastasia G. Drozd – <https://orcid.org/0000-0003-0633-213X>; Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>; Konstantin S. Brazovskiy – <https://orcid.org/0000-0002-4779-9820>; Maria S. Larkina – <https://orcid.org/0000-0003-1176-2441>; Sergei V. Krivoshchekov – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; Anton A. Artamonov – <https://orcid.org/0000-0002-7543-9611>; Irina A. Miloichikova – <https://orcid.org/0000-0001-7741-2810>; Artur V. Bezmaga – <https://orcid.org/0009-0006-5620-0820>; Alexey M. Bolshakov – <https://orcid.org/0000-0003-1663-9506>; Evgenia S. Sukhikh – <https://orcid.org/0000-0001-8251-2138>; Evgenii V. Plotnikov – <https://orcid.org/0000-0002-4374-6422>.

Received: 07.02.2023

Revised: 25.04.2023

Published: 25.05.2023

Abstract

Introduction. Radioresistance of cancer cells is a serious problem in radiation therapy of tumor diseases. Radiosensitizers make malignant cells more sensitive to radiation and increase the effectiveness of radiation therapy; however, their widespread clinical use is limited by significant side effects. The development and study of new radiosensitizers seems to be an urgent task of modern pharmacology.

Aim. The purpose of this work was to study the effectiveness of lithium ascorbate as a radiosensitizer under the influence of photon and neutron radiation in wide dose range.

Materials and methods. Evaluation of the biological effect was carried out using the tumor line of prostate cancer PC-3. We used a cyclotron to produce neutron radiation and a Cobalt-60 source to produce gamma radiation.

Results and discussion. We have proved an increase in the cytotoxic effect with the combined use of different types of ionizing radiation and lithium ascorbate. The resistance of the prostate cancer line to gamma radiation at an absorbed dose of 0.5–3.0 Gy was revealed. It was shown that tumor cells of prostate cancer are more sensitive to the effects of the study drug in minimal concentrations in combination with neutron irradiation compared to gamma radiation in the same absorbed dose. The main mechanism of the radiosensitizing action of lithium ascorbate is the local induction of oxidative stress, which synergistically enhances the action of ionizing radiation.

Conclusion. The combination of lithium ascorbate with neutron radiation leads to a more pronounced resulting cytotoxic effect. An increase in the concentration of lithium ascorbate led to the pro-oxidative action with an increase in the damaging effect on cells.

Keywords: lithium ascorbate, radiosensitization, prostate cancer, PC-3 cell line, gamma radiation, neutron radiation, apoptosis

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Maria S. Tretyakova, Anastasia G. Drozd, conducted a cell study of the biological properties. Evgenii V. Plotnikov carried out the preparation of the research plan, general management and discussion of the results. Mikhail V. Belousov, Konstantin S. Brazovskiy, Sergei V. Krivoshchekov carried out chemical synthesis, characterization of the drug and calculation of doses. Anton A. Artamonov, Evgenia S. Sukhikh performed the calculations and processed the results. Irina A. Miloichikova, Artur V. Bezmaga, Alexey M. Bolshakov performed experiments on the irradiation of cell cultures on a cyclotron and a source of gamma radiation. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

Funding. "Priority 2030" program of Tomsk Polytechnic University.

For citation: Tretyakova M. S., Drozd A. G., Belousov M. V., Brazovskiy K. S., Larkina M. S., Krivoshchekov S. V., Artamonov A. A., Miloichikova I. A., Bezmaga A. V., Bolshakov A. M., Sukhikh E. S., Plotnikov E. V. Study of the radiosensitizing action of lithium ascorbate under neutron and photon irradiation of tumor cells. *Drug development & registration*. 2023;12(2):185–189. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-185-189>

ВВЕДЕНИЕ

Развитие лучевой терапии привело к значительному улучшению клинических результатов лечения рака. Клинические руководства рекомендуют использовать фракционированную низкодозовую лучевую терапию, чтобы уменьшить побочные эффекты. Важным дополнительным фактором является применение радиосенсибилизаторов, т. е. веществ, повышающих радиочувствительность опухоли [1]. Одним из

ключевых механизмов воздействия лучевой терапии является запуск клеточной гибели, вследствие накопления критических повреждений ДНК. В целом повысить радиочувствительность раковых клеток можно с помощью химических веществ, образующих свободные радикалы и ингибирующих синтез ДНК [2]. Наряду с хорошо известными радиосенсибилизаторами, такими как миметики кислорода, цитотоксины, существует ряд веществ с потенциальной противо-

опухолевой активностью. Экспериментально доказаны стимулирующие эффекты лития на гемопоэз, что сыграет положительную роль при восстановлении организма после лучевой терапии при онкологических заболеваниях [3]. В ряде исследований подтвердилось нейропротекторное действие лития, что помимо прямого защитного эффекта в конечном итоге может привести к улучшению качества жизни после облучения [4]. Есть данные о противоопухолевом действии лития, так показано, что литий может ингибировать рост нейробластомы [5]. В наших предыдущих исследованиях сообщалось об антиоксидантной активности аскорбата лития [6]. К сожалению, клинически значимых результатов, подтверждающих противоопухолевую активность аскорбиновой кислоты, пока не опубликовано. Метаболизм аскорбиновой кислоты связан с механизмами, которые участвуют в устойчивости организма к образованию росту злокачественных новообразований [7]. Проксидантный эффект хорошо показан для аскорбиновой кислоты и ее солей [8]. Мы предполагаем, что высокая концентрация аскорбат аниона в зоне облучения позволит повысить уровень окислительного стресса, вызываемого ионизирующим излучением, что должно локально повысить противоопухолевое действие.

Данная работа направлена на изучение и сравнение эффектов фотонного и нейтронного излучений *in vitro* в сочетанном действии с радиосенсибилизатором – аскорбатом лития (LiAsc).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аскорбат лития получали *ex tempore* из аскорбиновой кислоты и карбоната лития (марка ACS, Sigma-Aldrich, Германия). Карбонат лития и аскорбиновую кислоту смешивали в мольном соотношении 1:2 и растворяли в деионизированной воде. Реакционную массу активно перемешивали до прекращения выделения газа. После охлаждения в реакционную массу добавляли трехкратный избыток этанола. Выпадающий белый кристаллический осадок собирали, промывали этанолом и высушивали. Получался белый кристаллический порошок, который использовали в экспериментах. Элементным анализом найдено – 33 % (C), 5,33 % (H), 8,1 % (Li₂O); теоретически вычислено – 33,03 % (C), 5,05 % (H), 8,21 % (Li₂O). Содержание воды в соли определено термогравиметрическим методом и составило 16,15 % (теоретическое – 16,51 %). Продукт реакции соответствовал формуле аскорбата лития дигидрата LiC₆H₇O₆ · 2H₂O. Радиосенсибилизирующие свойства аскорбата лития оценивали на культурах клеток аденокарциномы простаты (PC-3) человека. Клетки линии PC-3 культивировали в питательной среде RPMI 1640, обогащенной 10%-й эмбриональной бычьей сывороткой, глутамином и антибиотиками. Клетки подвергались лучевому воздействию в диапазоне поглощенных доз 0,5–3 Гр, в качестве источника нейтронов использовался циклотрон Р-7М (ТПУ, Россия), для фо-

тонного облучения использовался источник гамма-излучения на основе изотопа Co-60. Облучение образцов клеток осуществлялось в культуральных планшетах в поглощенной дозе 0,5, 1, 1,5, 2 и 3 Гр. Оценку метаболической активности клеток проводили с помощью стандартного МТТ-теста. Клетки вносили в лунки 96-луночного планшета в концентрации 5 тыс/лунка и инкубировали в течение 24 часов при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5%-м уровнем CO₂. Оптическую плотность раствора измеряли на планшетном спектрофотометре на длине волны 570 нм.

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения STATISTICA 12 (TIBCO Software Inc., США). Для сравнения данных использовали U-критерий Манна – Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента выполнено сравнение радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития в диапазоне концентраций 0,1–0,8 мМ на относительно радиоустойчивой клеточной культуре рака простаты человека при воздействии ионизирующего излучения разных видов. На рисунке 1, А показана жизнеспособность клеток РС-3 при воздействии гамма-излучения. Увеличение поглощенной дозы гамма-излучения до 3 Гр приводило к снижению жизнеспособности клеток на 20 % от необлученного контроля. Аскорбат лития усилил повреждающее воздействие облучения в диапазоне 0,1–0,3 мМ. В концентрации 0,4 мМ и выше воздействие приводит к практически полной гибели культуры с отдельными выживающими клонами. При воздействии нейтронного излучения отмечается более выраженное действие аскорбата лития даже в минимальной концентрации (рисунок 1, Б). При сочетанном действии жизнеспособность популяции клеток снизилась более чем на 50 %. Значения выживаемости клеток после нейтронного облучения показали, что дозовая зависимость для аскорбата лития имеет линейный характер до концентрации 0,3 мМ.

На рисунке 2 приведены результаты повреждающего действия ионизирующих излучений при добавлении аскорбата лития в установленных эффективных концентрациях 0,1 мМ (рисунок 2 А, Б) и 0,2 мМ (рисунок 2 В, Г). Показано достоверное падение жизнеспособности опухолевых клеток при комбинации соли лития с нейтронным и фотонным излучением.

Повреждение биообъектов при облучении в основном реализуется не за счет прямого повреждения макромолекул, а путем вторичного повреждения свободными радикалами, продуцируемыми вследствие радиолитиза воды. В свою очередь, нейтроны повреждают клетки в основном путем прямого повреждения макромолекул, в первую очередь в ядерных структурах клетки [9]. При действии аскорбата в высоких концентрациях совместно с ионизирующим

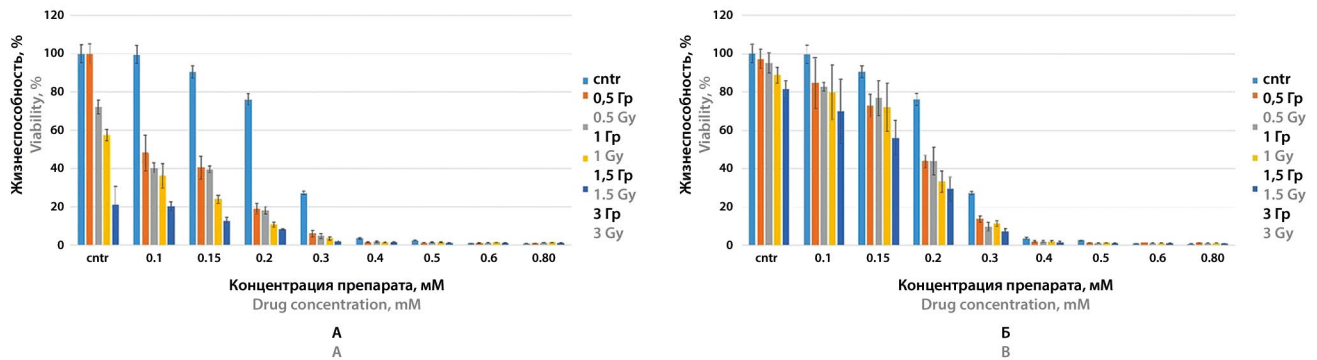


Рисунок 1. Жизнеспособность клеток линии PC-3 при лучевом воздействии в поглощенной дозе 0,5–3 Гр в комбинации с аскорбатом лития.

A – гамма-излучение; **Б** – нейтронное излучение

Figure 1. Survival of PC-3 cells under radiation exposure at an absorbed dose of 0.5–3 Gy in combination with lithium ascorbate.

A – gamma radiation; **B** – neutron radiation

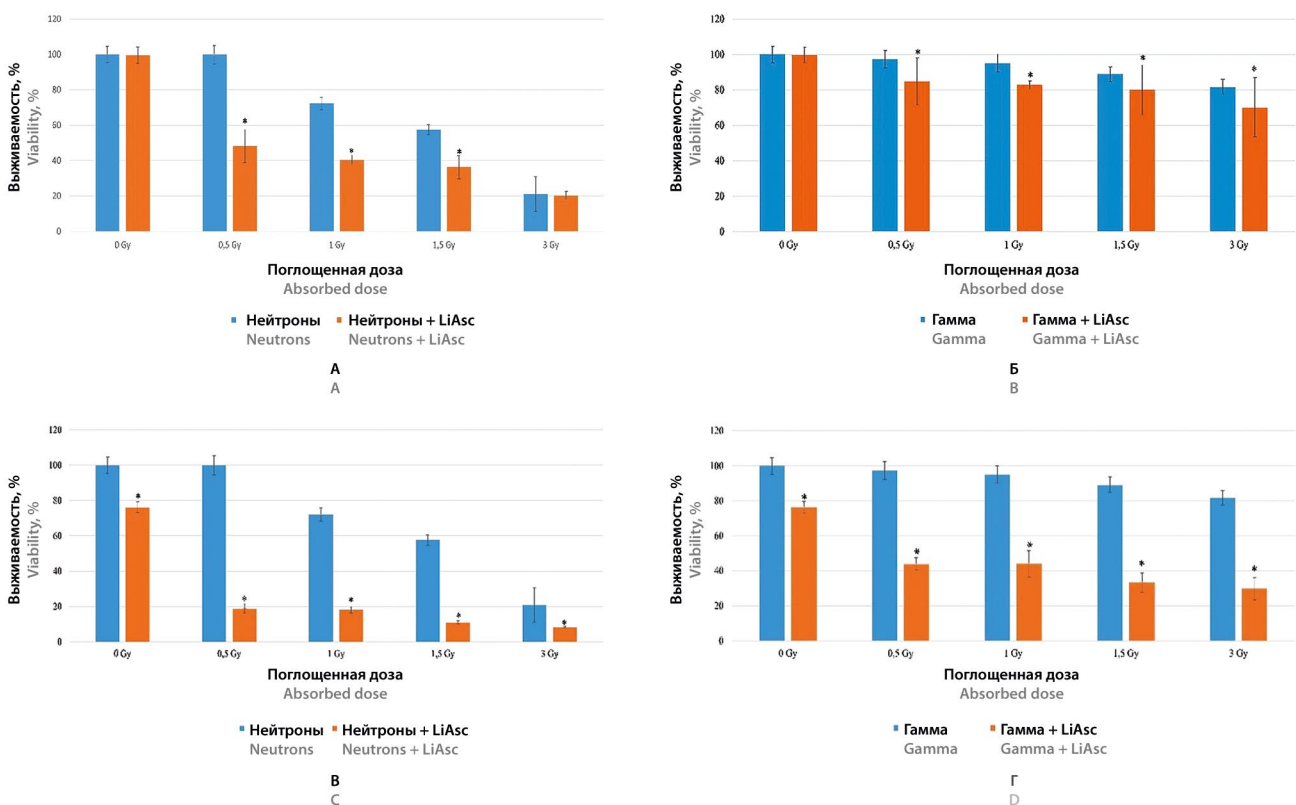


Рисунок 2. Выживаемость опухолевых клеток линии PC-3 при лучевом воздействии в комбинации с аскорбатом лития.

A – нейтронное облучение в сочетании с LiAsc (0,1 мМ); **Б** – гамма-облучение в сочетанном действии с LiAsc (0,1 мМ); **В** – нейтронное облучение в сочетании с LiAsc (0,2 мМ); **Г** – гамма-облучение в сочетанном действии с LiAsc (0,2 мМ).

Примечание. * Различия статистически значимы в сравнении с группой облучения без препарата, $p < 0,05$

Figure 2. Viability of PC-3 tumor cells under radiation exposure in combination with lithium ascorbate.

A – neutron radiation in combination with LiAsc (0.1 mM); **B** – gamma irradiation in combined action with LiAsc (0.1 mM); **C** – neutron irradiation in combination with LiAsc (0.2 mM); **D** – gamma irradiation in combined action with LiAsc (0.2 mM).

Note. * Differences are statistically significant in comparison with the radiation group without the drug, $p < 0,05$

излучением наблюдается известная общность их повреждающего действия на клеточные структуры, которая реализуется главным образом путем вторичной продукции активных форм кислорода. Окисли-

тельный стресс нарастает вследствие радиолитического действия воды и прооксидантного действия аскорбата. Генерируемые свободные радикалы вызывают каскад деструктивных реакций, которые в данном случае могут

быть усилены действием радиосенсибилизатора. Таким образом, совпадение основных повреждающих механизмов локально приводит к усилению повреждающего действия на клетки, что и подтвердилось в экспериментах (см. рисунок 1). Действие сенсибилизатора в оптимальном диапазоне доз показано на рисунке 2, где уже в поглощенной нейтронной дозе 0,5 Гр наблюдается снижение жизнеспособности клеток более чем на 50 и на 80 % при сочетании с аскорбатом в дозах 0,1 и 0,2 мМ соответственно. Эффекты при сочетании с гамма-излучением менее выражены, однако и здесь отмечено снижение жизнеспособности на 15 и 50 % соответственно. В наших экспериментах было подтверждено, что опухолевые клетки рака простаты более чувствительны к воздействию исследуемого препарата в минимальных концентрациях в сочетании с нейтронным облучением в сравнении с гамма-излучением в одинаковой поглощенной дозе. При этом без сенсибилизации аденокарцинома простаты оказалась устойчивой к небольшим дозам нейтронов (0,5 и 1 Гр), а гамма-излучение при отдельном применении не приводило к снижению жизнеспособности более чем на 15 % даже в дозе 3 Гр (см. рисунок 2). В ходе экспериментов было выявлено, что цитотоксическое действие ионизирующего излучения в комбинации с аскорбатом в основном реализуется путем индукции апоптоза. Основная гипотеза радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития заключается в том, что определенные концентрации аскорбата лития в клеточной культуре могут проявлять прооксидантное действие и индуцировать окислительный стресс, синергетически усиливающий действие ионизирующего излучения. На основе полученных данных был предложен механизм действия аскорбата лития на опухолевые клетки посредством интенсификации образования H_2O_2 при самоокислении аскорбата в условиях повышенной концентрации аскорбата лития и перекиси водорода, образовавшейся в результате радиолиза воды. Параллельный возможный механизм радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития связан с ингибированием натрий-зависимых транспортных белков аскорбиновой кислоты (преимущественно, SVCT2), которые экспрессируются на мембране. При повышении относительной концентрации литий, вероятно, способен существенно снижать ко-транспорт аскорбиновой кислоты. Однако роль этого механизма в регуляции захвата аскорбиновой кислоты и вклад в радиосенсибилизирующую активность требует дополнительного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано усиление цитотоксического эффекта при сочетанном применении лучевого воздействия и аскорбата лития. Радиосенсибилизирующее действие аскорбата лития более выражено при сочетании с нейтронным облучением.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gong L., Zhang Y., Liu C., Zhang M., Han S. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2021;16:1083–1102. DOI: 10.2147/ijn.s290438.
2. Pfeffer C. M., Singh A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(2):448. DOI: 10.3390/ijms19020448.
3. Greenberg D. B., Younger J., Kaufman S. D. Management of lithium in patients with cancer. *Psychosomatics*. 1993;34(5):388–394. DOI: 10.1016/s0033-3182(93)71841-1.
4. Forlenza O. V., De-Paula V. J. R., Diniz B. S. O. Neuroprotective effects of lithium: implications for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *ACS Chemical Neuroscience*. 2014;5(6):443–450. DOI: 10.1021/cn5000309.
5. Duffy D. J., Krstic A., Schwarzl T., Higgins D. G., Kolch W. GSK3 inhibitors regulate MYCN mRNA levels and reduce neuroblastoma cell viability through multiple mechanisms, including p53 and Wnt signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014;13(2):454–467. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-13-0560-t.
6. Plotnikov E. V., Korotkova E. I., Voronova O. A., Dorozhko E. V., Bohan N. A., Plotnikov S. Lithium-based antioxidants: electrochemical properties and influence on immune cells. *Physiology and Pharmacology*. 2015;19(2):107–113.
7. Cameron E., Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976;73(10):3685–3689. DOI: 10.1073/pnas.73.10.3685.
8. Chen Q., Espey M. G., Sun A. Y., Pooput C., Kirk K. L., Krishna M. C., Khosh D. B., Drisko J., Levine M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(32):11105–11109. DOI: 10.1073/pnas.0804226105.
9. Baiocco G., Barbieri S., Babini G., Morini J., Alloni D., Friedland W., Kundrát P., Schmitt E., Puchalska M., Sihver L., Ottolenghi A. The origin of neutron biological effectiveness as a function of energy. *Scientific Reports*. 2016;6(1):34033. DOI: 10.1038/srep34033.