

ДИНАМИКА ПРОНИКНОВЕНИЯ “ТВЕРДЫХ” НАНОКОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК С ГАДОЛИНИЕМ В КЛЕТКИ СНО

© 2013 г. В. И. Попенко*, О. Г. Леонова, В. И. Сальянов, Н. Н. Орлова, П. В. Спирин,
В. С. Прасолов, Ю. М. Евдокимов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, 119991, Москва

Поступила в редакцию 21.12.2012 г.

Принята к печати 28.04.2013 г.

Нейтрон-захватная терапия – перспективное направление терапии злокачественных опухолей. В основе этого метода лежит реакция захвата тепловых нейтронов некоторыми нерадиоактивными элементами (например, Gd^{157}) с последующим излучением электронов и гамма-квантов. Эффективным средством доставки гадолиния в ткани могут оказаться частицы “твердых” наноконструкций на основе комплексов двухцепочечной ДНК с гадолинием (НК-Gd), локальная концентрация гадолиния в которых может достигать 40%. Для оптимизации процесса нейтрон-захватной терапии большое значение имеет вопрос о возможности проникновения частиц НК-Gd в клетки и динамика этого процесса. В настоящей работе изучена динамика взаимодействия НК-Gd с культивируемыми клетками яичника китайского хомячка (СНО) при помощи конфокальной и электронной микроскопии. Показано, что частицы НК-Gd способны проникать в клетки СНО. Этот процесс начинается примерно через 1 ч после начала инкубации; через 6 ч внутри практически всех клеток обнаруживаются частицы НК-Gd. Дальнейшее увеличение времени инкубации не приводит к заметным изменениям морфологии клеток, хотя количество НК-Gd внутри них увеличивается, а плазматическая мембрана остается неповрежденной. Частицы НК-Gd, проникшие в клетки, сохраняются в них на протяжении длительного времени. Показано, что присутствие частиц НК-Gd не изменяет существенно численности популяции клеток даже при продолжительной (до 144 ч) инкубации. Учет названных выше результатов имеет важное значение для повышения эффективности метода нейтрон-захватной терапии.

Ключевые слова: нейтрон-захватная терапия, наноконструкции ДНК, конфокальная микроскопия, электронная микроскопия.

DYNAMICS OF PENETRATION OF “SOLID” NANOCONSTRUCTIONS BASED ON DOUBLE-STRANDED DNA COMPLEXED WITH GADOLINIUM INTO CHO CELLS, by V. I. Popenko*, O. G. Leonova, V. I. Salyanov, N. N. Orlova, P. V. Spirin, V. S. Prasolov, Y. M. Evdokimov (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: popenko@eimb.ru). Currently, neutron capture therapy is a promising cancer treatment. This method is based on the reaction of the thermal neutron capture by some non-radioactive elements (e.g. Gd^{157}), which results in subsequent emission of electrons and gamma rays. An effective instrument for delivery of gadolinium into the tumor tissue are the particles of the “rigid” nanostructures (NS) based on double-stranded DNA complexes with gadolinium (NS-Gd). The local concentration of Gd in such nanostructures may reach 40%. To optimize the process of neutron capture therapy it is very important to investigate possible penetration mechanisms of NS-Gd particles into the tumor cells. In this work, the dynamics of interaction NS-Gd with cultivated chinese hamster ovary cells (CHO) was studied by confocal and electron microscopy. It is shown that NS-Gd are able to enter CHO cells. This process begins in about 1 hour after the start of incubation. After 6 h NS-Gd particles were detected in almost all cells. A further increase of the incubation time does not lead to significant changes in cell morphology, although the number NS-Gd inside the cells increases. The plasma membrane of the cells remains intact. The NS-Gd particles, which entered the cells, remain inside the cells for a long time. The data obtained show that NS-Gd are relatively low-toxic and suggest that the presence of NS-Gd in the tumor cells does not prevent their division. The data obtained are important for improving the efficiency of the neutron capture therapy method.

Keywords: neutron capture therapy, ds DNA-based nanostructures, confocal microscopy, electron microscopy.

DOI: 10.7868/S0026898413050170

* Эл. почта: popenko@eimb.ru

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время нейтрон-захватная терапия (НЗТ) считается перспективным направлением, применяемым при онкологических заболеваниях. В основе этого метода лежит реакция захвата тепловых нейтронов некоторыми нерадиоактивными элементами с последующим излучением электронов и гамма-квантов. Наибольший интерес вызывает стабильный изотоп Gd^{157} . При облучении пучком тепловых нейтронов Gd^{157} , входящий в состав природных солей гадолиния (15.6% в природных образцах), взаимодействуя с нейтронами, превращается в стабильный изотоп Gd^{158} . Эта реакция сопровождается появлением Оже-электронов и рентгеновских лучей, под действием которых близко расположенные клетки, в частности, опухолевые, эффективно разрушаются.

Успех гадолиниевой НЗТ зависит от нескольких взаимосвязанных факторов: от плотности потока тепловых нейтронов, времени облучения клеток, а также от степени накопления гадолиния внутри клеток [1].

Известно, что свободные ионы гадолиния токсичны даже при введении в ткани в низких дозах [2–4], поэтому для уменьшения их токсичности используют полимерные лиганды, способные образовывать стабильные и прочные комплексы с Gd^{3+} .

Другая важная проблема НЗТ – необходимость поддерживать достаточно высокую концентрацию гадолиния в ткани опухоли в течение всего процесса ее облучения тепловыми нейтронами. Для решения этой проблемы разрабатываются пространственные молекулярные конструкции с высоким сродством к гадолинию, содержащие большое количество гадолиния и обеспечивающие его стабильно высокую концентрацию в тканях в течение длительного времени [2–4].

В качестве перспективного материала с регулируемыми свойствами для НЗТ были предложены комплексы гадолиния с двухцепочечной ДНК (дцДНК), образующей частицы жидкокристаллической дисперсии (так называемые “твердые” наноконструкции) [4, 5].

“Твердые” наноконструкции на основе комплексов дцДНК с гадолинием (НК-Gd), в которых локальная концентрация гадолиния может достигать 40%, имеют вид округлых частиц со средним размером ~ 0.5 мкм (согласно данным АСМ [6]). Первая попытка практического применения в НЗТ “твердых” наноконструкций, добавленных непосредственно в культуральную среду, содержащую клетки яичника китайского хомячка (СНО) в культуре, показала, что наноконструкции можно рассматривать в качестве перспективных носителей гадолиния для НЗТ [6].

Можно сказать, что успех рассмотренного варианта реализации НЗТ будет зависеть не только от использования наноконструкций на основе дцДНК, посредством которых гадолиний можно эффективно вводить в межклеточное пространство, но и от того, смогут ли такие наноконструкции проникать в клетки опухоли до начала облучения тепловыми нейтронами. Это означает, что вопрос о возможности проникновения наноконструкций, содержащих Gd^{157} , в нужные клетки приобретает первостепенное значение.

Цель настоящей работы состояла в изучении динамики проникновения наноконструкций НК-Gd в клетки СНО. Динамику проникновения НК-Gd в клетки изучали при помощи электронной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. Перевиваемые клетки СНО яичников китайского хомячка выращивали на стандартной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 4 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед./мл, соответственно, при температуре 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Для посева клеток клеточный монослой промывали фосфатно-солевым буфером (PBS – 10 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4), добавляли стандартный раствор трипсин-EDTA, (“Sigma”) и помещали в CO_2 -инкубатор на 3–5 мин, добавляли среду с FBS и суспендировали пипетированием. Клетки рассевали в необходимое количество культуральных флаконов.

Приготовление “твердых” наноконструкций на основе комплексов дцДНК с гадолинием в культуральной среде, а также используемые при этом компоненты, подробно описаны в работе [6].

Процент жизнеспособных клеток определяли путем окрашивания трипановым синим (“Invitrogen”, кат.15250-061) по методике фирмы-производителя. Долю клеток в состоянии апоптоза определяли с помощью проточного цитофлуориметра EpicsXL (“Beckman Coulter”) после окрашивания аннексином (“Invitrogen”, кат.А13199) и йодистым пропидием (“Invitrogen”) по методике фирмы-производителя. Измерения завершали при накоплении 10000 событий. Сбор и учет данных производили с использованием программного обеспечения WinMDL 2.8.

Облучение клеток СНО тепловыми нейтронами проводили как описано в [6].

Электронная микроскопия. Для электронной микроскопии клетки СНО фиксировали в тече-

ние 40 мин при комнатной температуре, заменяя среду культивирования в чашках Петри на раствор 2%-ного глутарового альдегида в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2). Затем клетки осторожно снимали скребком. Контрольные опыты показали, что такая процедура не приводила к повреждениям клеток и обеспечивала наилучшую сохранность их морфологии.

После облучения клеток СНО тепловыми нейтронами в присутствии частиц НК-Gd клетки могут разрушаться. В связи с этим при изучении облученных клеток особенно важно полностью исключить возможность механических повреждений клеточной оболочки. Поэтому в последнем случае клетки снимали без использования скребка трипсином и фиксировали в указанном выше фиксаторе. Эта процедура позволила полностью исключить механические повреждения клеток в ходе приготовления образцов, однако приводила к тому, что клетки теряли характерную веретеновидную форму, при этом происходило некоторое набухание цитоплазмы и ядерных структур.

После фиксации клетки осаждали центрифугированием (500 g, 5 мин), суспендировали в 2%-ном агар-агаре на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2) и постфиксировали 1%-ным раствором OsO₄ в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2, 1 ч, 4°C). После промывки в 0.1 М фосфатном буфере образцы обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и заключали в смесь эпон-аралдит по стандартной методике.

Конфокальная микроскопия. Клетки СНО выращивали на покровных стеклах (18 × 18 мм), как описано выше, и изучали при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5. Для идентификации частиц НК-Gd в конфокальном микроскопе использовали флуоресцентный краситель SYBR Green I.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения взаимодействия с комплексами НК-Gd клетки СНО культивировали в течение 1, 3, 6, 12, 24, 72, 144 ч в среде с добавлением НК-Gd. Динамику проникновения НК-Gd в клетки изучали при помощи электронной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Микрофотографии клеток, инкубированных в течение 1, 3, 12, 24 и 72 ч, и данные конфокальной микроскопии приведены в Приложении (см. дополнительные материалы на сайте www.molecbio.com/downloads/2013/5/supp_porenko_rus.pdf). В тех случаях, когда срез клетки не помещался полностью в один кадр, на рисунках представлены комбинированные изображения из нескольких перекрывающихся кадров.

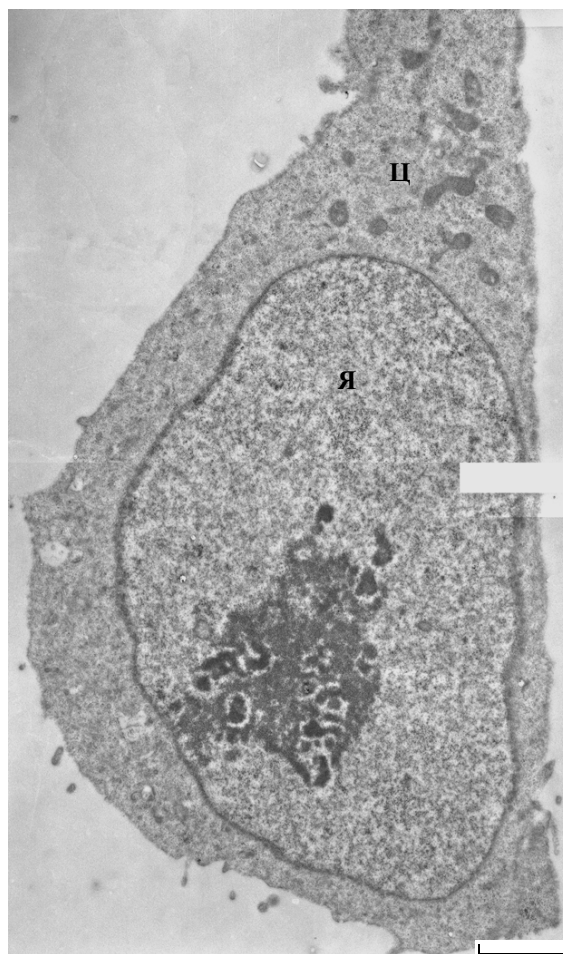


Рис. 1. Клетка СНО из контрольного препарата без обработки частиц НК-Gd. Здесь и далее: Я – ядро, Ц – цитоплазма. Масштабный отрезок 2 мкм.

На рис. 1 показана электронно-микроскопическая микрофотография типичной клетки СНО из контрольного препарата (без обработки частицами НК-Gd). Веретенообразная форма клеток свидетельствует об отсутствии механических повреждений при их снятии с поверхности чашек Петри и последующей фиксации. Округлое ядро, иногда неправильной формы, находится в центре, содержит одно или несколько ядрышек с одним или несколькими фибриллярными центрами и хорошо выраженной нуклеолонемной структурой гранулярного компонента.

После инкубации клеток с частицами НК-Gd в течение 1 ч изменений в структуре клеток не наблюдается. Комплексы НК-Gd, которые на электронно-микроскопических препаратах легко идентифицировать благодаря их высокой электронной плотности, находятся вне клеток (рис. 2). В отдельных клетках (не более 5% всей популяции) небольшие скопления частиц НК-



Рис. 2. Клетка СНО из препарата после инкубации с наноконструкциями НК-Gd в течение 1 ч. Частицы НК-Gd располагаются вне клеток (стрелки). Они легко идентифицируются благодаря высокой электронной плотности. На этом и следующих рисунках: стрелки – наноконструкции НК-Gd, расположенные вне клеток, короткие стрелки – наноконструкции НК-Gd внутри клеток. Масштабный отрезок 2 мкм.

Gd обнаружены в цитоплазме (см. Приложение рис. 1, www.molecbio.com/downloads/2013/5/supp_popenko_rus.pdf).

После инкубации с частицами НК-Gd в течение 3 ч (см. Приложение, рис. 2) около 50% клеток содержат внутри скопления частиц НК-Gd, а через 6 ч (рис. 3) указанные частицы присутствуют уже практически во всех клетках. При этом морфология ядра, ядрышка, цитоплазмы и мито-

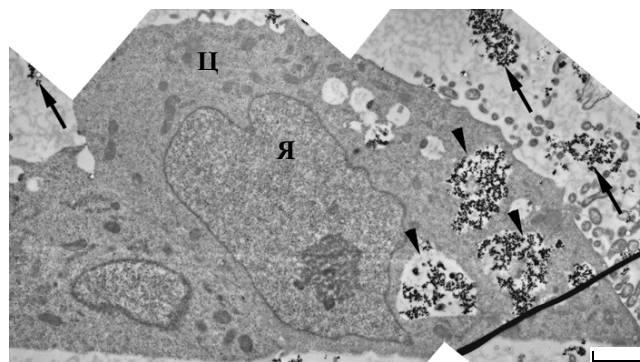


Рис. 3. Клетка СНО из препарата после инкубации с наноконструкциями НК-Gd в течение 6 ч. Частицы НК-Gd присутствуют практически во всех клетках. Морфология ядра, ядрышка, цитоплазмы, митохондрий не отличается от морфологии этих образований в контроле (рис. 1). Масштабный отрезок 2 мкм.

хондрий не отличаются от морфологии этих образований в контрольных опытах (не показано).

Частицы НК-Gd располагаются в цитоплазме клеток в образующихся полостях. При увеличении времени инкубации размер таких полостей увеличивается. Так, если после 3 ч инкубации полости с НК-Gd обычно имели на срезах диаметр ~ 0.5–2 мкм (см. Приложение, рис. 2), то через 6 ч – от 0.5 до 5 мкм (рис. 3).

Дальнейшее увеличение времени инкубации (12 ч) не приводит к существенным изменениям морфологии клеток, хотя количество частиц НК-Gd внутри них увеличивается (см. Приложение, рис. 3).

Частицы НК-Gd, проникшие в клетки, сохраняются в них на протяжении не менее 24 ч. Наши опыты показали, что после переноса клеток СНО, инкубированных с частицами НК-Gd в течение 12 ч, в чистую среду на 24 ч структуры НК-Gd по-прежнему обнаруживаются в крупных полостях внутри цитоплазмы практически всех клеток (рис. 4). Кроме того, в цитоплазме появляются аутофагосомы, внутри которых видны остатки клеточных структур.

Ранее с использованием атомно-силовой микроскопии [6] было показано, что высушенные препараты НК-Gd имеют вид компактных частиц размером от 0.2 до 0.8 мкм (средний размер ~ 0.5 мкм). На ультратонких срезах видно, что в среде для культивирования клеток наноконструкции НК-Gd разрыхляются. Размер структур НК-Gd на ультратонких срезах составляет 0.2–2 мкм (рис. 5).

Результаты электронной микроскопии, свидетельствующие о проникновении частиц НК-Gd в клетки СНО, подтверждаются данными конфо-

кальной микроскопии (см. Приложение, рис. 4, рис. 5). Следует отметить, что при помощи конфокальной и электронной микроскопии мы выявляем разные компоненты НК-Gd: электронно-микроскопически мы наблюдаем прежде всего электронно-плотные структуры, содержащие гадолиний, а в конфокальном микроскопе видна флуоресценция красителя SYBR Green, связанного с ДНК в составе частиц НК-Gd. Совпадение результатов, полученных этими разными методами, позволяет заключить, что частицы НК-Gd способны проникать в клетки. Процесс проникновения начинается примерно через 1 ч после начала инкубации клеток СНО с частицами НК-Gd, и через 6–12 ч практически все клетки содержат частицы НК-Gd.

Доля клеток СНО в состоянии апоптоза, определенная с помощью проточной цитофлуориметрии и окрашивания аннексинном и йодистым пропидием, составляла 0.015 ± 0.002 в контроле, 0.040 ± 0.005 после инкубации в течение 3 ч в присутствии НК-Gd и 0.067 ± 0.004 через 24 ч. Для определения жизнеспособности клеток СНО в среде, содержащей НК-Gd, проведен стандартный тест по окрашиванию клеток витальным красителем трипановым синим. Результаты, представленные на рис. 6, показывают, что общее число клеток, культивируемых в среде с НК-Gd в течение 144 ч, в пределах ошибки измерения не отличалось от числа в контроле (небольшое снижение наблюдалось только для 72-часовой культуры).

Процент жизнеспособных, неповрежденных клеток был примерно одинаковым и в контрольных клетках, и в клетках, культивируемых в среде с добавлением НК-Gd менее 24 ч (77–84%). При инкубации в течение 24 ч и более содержание неокрашенных клеток в присутствии НК-Gd уменьшалось на 12–20% по сравнению с контролем и составляло 53–62%.

Согласно данным электронной и конфокальной микроскопии (рис. 3, рис. 4 и Приложение, рис. 3, рис. 5) через 6–12 ч инкубации в среде с НК-Gd все клетки СНО содержали частицы НК-Gd. При этом окрашивание трипановым синим показало, что не менее 80% клеток имеют неповрежденную мембрану (рис. 6). Согласно полученным результатам, частицы НК-Gd способны

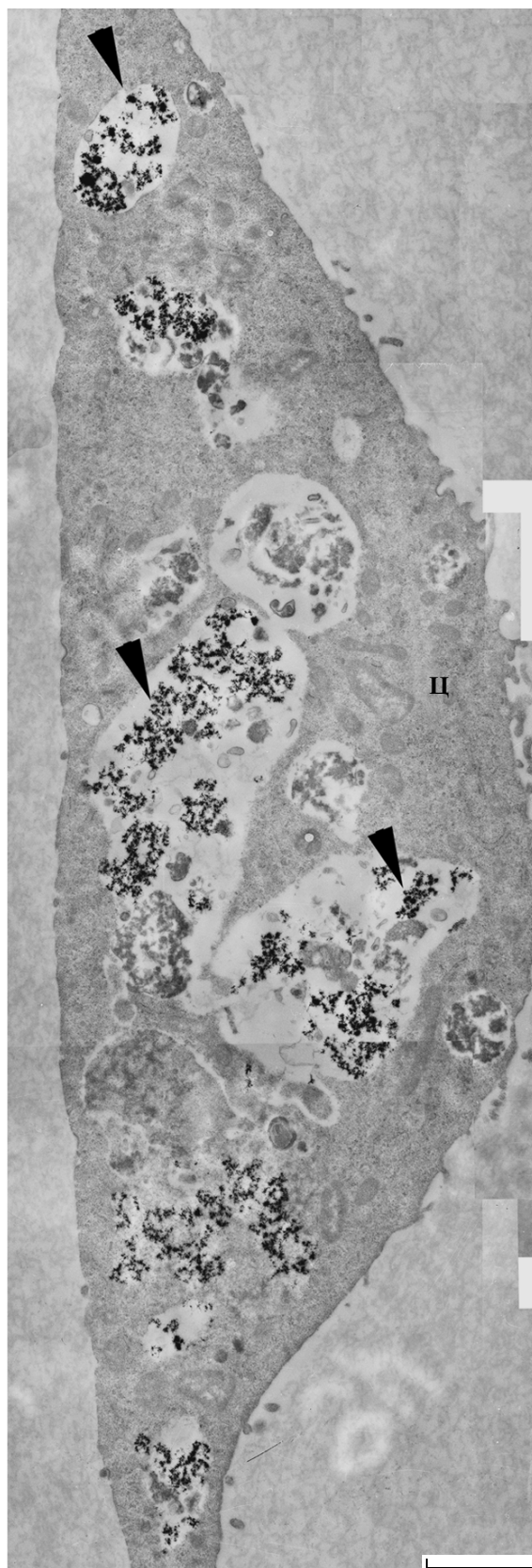


Рис. 4. Клетка СНО после инкубации в среде с наноконструкциями НК-Gd в течение 12 ч и переноса в чистую среду на 24 ч. Частицы НК-Gd обнаруживаются в крупных полостях внутри цитоплазмы практически во всех клетках. В цитоплазме появляются аутофагосомы, внутри которых видны остатки клеточных структур. Масштабный отрезок 2 мкм.

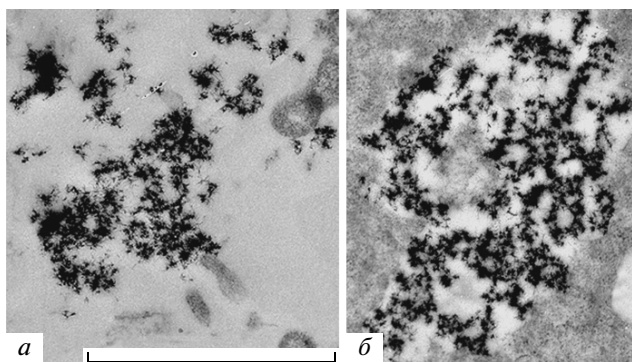


Рис. 5. Ультратонкие срезы наноконструкций НК-Gd. Размер скоплений на ультратонких срезах составляет 0,2–1 мкм. *a* – 1 ч, *б* – 6 ч. Масштабный отрезок 1 мкм.

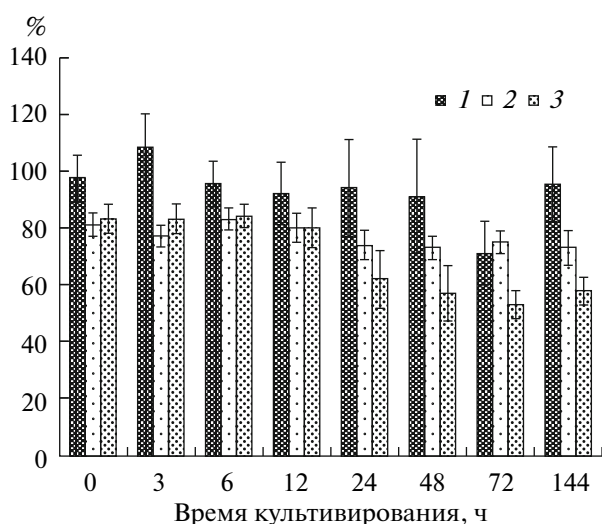


Рис. 6. Зависимость количества клеток СНО в популяции и их жизнеспособности от сроков инкубации в среде с наноконструкциями НК-Gd. 1 – Отношение числа клеток в среде с НК-Gd к числу клеток в контроле (без НК-Gd); 2 – процент жизнеспособных клеток в контроле; 3 – процент жизнеспособных клеток в среде с НК-Gd.

проникать в клетки, не повреждая их плазматическую мембрану. Можно полагать, что в течение первых 12 ч даже у клеток, окрашиваемых трипановым синим, повреждения плазматической мембраны невелики, так как на одиночных электронно-микроскопических срезах они не обнаруживаются. Напротив, нарушения целостности клеточных мембран очень заметны при длительных сроках инкубации. Так, после инкубации с частицами НК-Gd в течение 72 ч внутри клеток обнаруживаются большие скопления частиц НК-Gd, и примерно у 30% клеток на срезах нарушена

мембрана (см. Приложение, рис. 6), что хорошо соответствует данным, представленным на рис. 6. Цитоплазма внутри таких клеток заполнена мембранными пузырьками, митохондрии – набухшие.

Отсутствие резкого снижения числа клеток в присутствии частиц НК-Gd по сравнению с контролем (рис. 6) показывает, что клетки СНО, содержащие частицы НК-Gd, способны делиться. На рис. 7 представлен срез двух клеток, инкубированных в течение 144 ч. Одна из них заполнена частицами НК-Gd и разрушена, а во второй, расположенной рядом, частиц НК-Gd мало. Можно предположить, что вторая клетка представляет собой одну из поделившихся дочерних клеток, которая способна нормально функционировать.

Облучение тепловыми нейтронами клеток СНО в присутствии частиц НК-Gd приводило к сильному повреждению клеток и гибели большинства из них. Основная часть клеток разрушалась. На рис. 8 представлен пример такой клетки, инкубированной в среде с частицами НК-Gd в течение 3 ч и подвергнутой облучению тепловыми нейтронами. Частицы НК-Gd находятся в цитоплазме. Столь сильные повреждения клеток и разрушение клеточной мембраны связаны именно с облучением их нейтронами в присутствии частиц НК-Gd, но не с механическими факторами в процессе приготовления препаратов. Как показано выше, в течение по крайней мере первых 12 ч инкубации клеток в среде с частицами НК-Gd эти частицы проникают в клетки, не разрушая их. Гибель таких клеток происходит только после облучения нейтронами. Кроме того, чтобы полностью исключить механические повреждения клеток в ходе приготовления образцов, в опытах с облучением нейтронами клетки собирали не скребком, а путем обработки трипсином (см. “Экспериментальную часть”). Это приводило к тому, что клетки теряли характерную веретеновидную форму, но их цитоплазматическая мембрана не разрушалась (Приложение, рис. 7). Ранее на светооптическом уровне показали, что добавление НК-Gd в среду приводит к эффективной гибели клеток СНО при облучении нейтронами [6], что хорошо согласуется с нашими электронно-микроскопическими данными.

Результаты, полученные в нашей работе, позволяют сделать несколько важных выводов. Во-первых, из них следует, что присутствие частиц НК-Gd не приводит к существенным изменениям численности популяции клеток даже при длительных (до 144 ч) сроках инкубации. Во-вторых, они показывают, что время проникновения частиц НК-Gd в клетки СНО составляет от 1 до 6 ч.

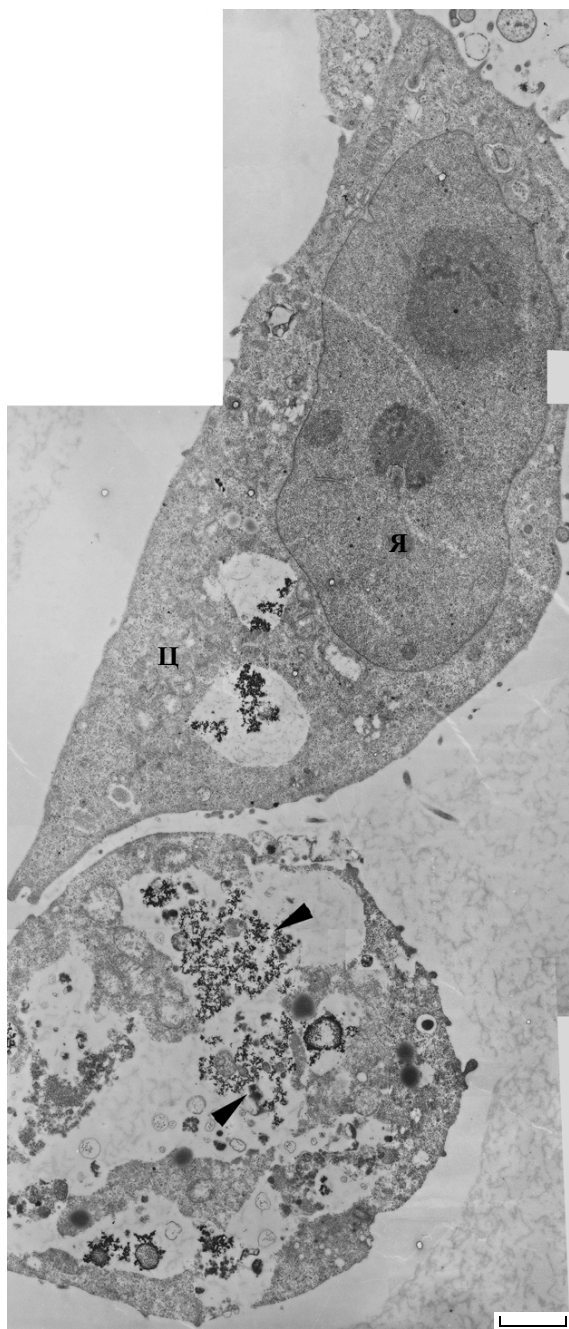


Рис. 7. Две клетки CHO после 144 ч инкубации в среде с НК-Gd. Клетка в нижней части рисунка разрушена, в то время как в верхней клетке частиц НК-Gd очень мало. Масштабный отрезок 2 мкм.

Наконец, в присутствии частиц НК-Gd клетки CHO, облученные потоком тепловых нейтронов, гибнут, в то время как контрольные клетки, не содержащие частиц НК-Gd, после облучения тепловыми нейтронами остаются живыми.

Сочетание полученных результатов свидетельствует о возможности оптимизации метода НЗТ с использованием частиц НК-Gd в качестве носи-

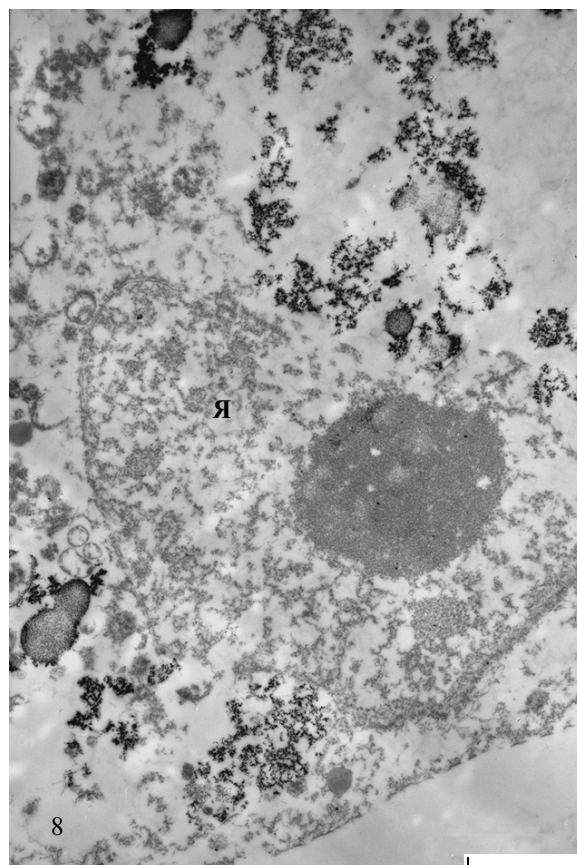


Рис. 8. Клетка CHO, инкубированная в среде с наноконструкциями НК-Gd, после облучения. В этих условиях клетки сильно повреждаются и погибают. В цитоплазме находятся частицы НК-Gd. Масштабный отрезок 2 мкм.

теля гадолиния. В частности, предварительная инкубация культуры клеток с частицами НК-Gd в течение определенного времени, позволяющая этим частицам проникнуть внутрь клеток, может открыть дорогу к сокращению плотности потока тепловых нейтронов и времени самого облучения. Учет приведенных результатов может привести к повышению эффективности метода НЗТ и уменьшению стоимости всей процедуры НЗТ, что имеет важное практическое значение.

Авторы благодарны В.А. Григорьеву за техническую помощь при электронно-микроскопическом изучении препаратов и Т.Д. Лебедеву за участие в опытах по определению числа клеток в состоянии апоптоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (11-04-01967-а и 12-04-00424-а) и Программ фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”

и “Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saha T.K., Jono K., Ichikawa H., Fukimori Y. 1998. Preparation and evaluation of glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a gadolinium reservoir for neutron-capture therapy. *Chem. Pharm. Bull.* **46**(3), 537–539.
2. Greisberg J.K., Wolfe J.M., Wyman J., Zou L., Terek R.M. 2001. Gadolinium inhibits thymidine incorporation and induces apoptosis in chondrocytes. *J. Orthop. Res.* **19**(5), 797–801.
3. Mizgerd J.P., Molina R.M., Stearns R.C., Brain J.D., Warner A.E. 1996. Gadolinium induces macrophage apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* **59**(2), 189–195.
4. Bartolini M.E., Pekar J., Chettle D.R., McNeill F., Scott A., Sykes J., Prato F.S., Moran G.R. 2003. An investigation of the toxicity of gadolinium based MRI contrast agents using neutron activation analysis. *Magn. Reson. Imaging.* **21**(5), 541–544.
5. Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Kondrashina O.V., Borshevsky V.I., Semenov S.V., Gasanov A.A., Reshetov I.V., Kuznetsov V.D., Nikiforov V.N., Akulinichev S.V., Mordovskoi M.V., Potashev S.I., Skorkin V.M. 2005. Particles of liquid–crystalline dispersions formed by (nucleic acid–rare earth element) complexes as a potential platform for neutron capture therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* **37**, 165–173.
6. Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Akulinichev S.V., Skorkin V.M., Spirin P.V., Orlova N.N., Popenko V.I., Prassolov V.S. 2011. Novel biomaterial for NCT-“Rigid” particles of (DNA-Gadolinium) liquid crystalline dispersions. *J. Biomat. Nanobiotech.* **2**, 281–292.