

DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-4-34-42

УДК: 616-006.484-08:615.849.1]-092.4

Для цитирования: Бывальцев В.А., Завьялов Е.Л., Каныгин В.В., Касатова А.И., Кичигин А.И., Разумов И.А., Сычева Т.В., Таскаев С.Ю. Цитопатические эффекты бор-нейтронозахватной терапии на ускорительном источнике эпителиальных нейтронов для культуры клеток глиобластомы человека. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18(4): 34–42. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-4-34-42.

For citation: Byvaltsev V.A., Zavjalov E.L., Kanygin V.V., Kasatova A.I., Kichigin A.I., Razumov I.A., Sycheva T.V., Taskaev S.Yu. Cytopathic effects of accelerator-based boron neutron capture therapy on human glioblastoma cells. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18(4): 34–42. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-4-34-42.

ЦИТОПАТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ НА УСКОРИТЕЛЬНОМ ИСТОЧНИКЕ ЭПИТЕЛЛОВЫХ НЕЙТРОНОВ ДЛЯ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

В.А. Бывальцев^{1,2,3}, Е.Л. Завьялов^{4,5}, В.В. Каныгин⁵, А.И. Касатова^{1,5},
А.И. Кичигин^{1,5}, И.А. Разумов^{4,5}, Т.В. Сычева^{5,6}, С.Ю. Таскаев^{5,6}

Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск, Россия¹

Россия, г. Иркутск, 664022, ул. 3 июля, 8. E-mail: yarullinaai@yahoo.com¹

НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский», г. Иркутск, Россия²

Россия, г. Иркутск, 664005, ул. Боткина, 10²

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», г. Иркутск, Россия³

Россия, г. Иркутск, 664003, ул. Борцов Революции, 1³

Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия⁴

Россия, г. Новосибирск, 630090, просп. ак. Лаврентьева, 10⁴

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия⁵

Россия, г. Новосибирск, 630090, ул. Пирогова, 1⁵

Институт ядерной физики СО РАН, г. Новосибирск, Россия⁶

Россия, г. Новосибирск, 630090, просп. ак. Лаврентьева, 11⁶

Аннотация

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) – экспериментальный метод лучевой терапии, основанный на селективном повреждении клеток злокачественных опухолей за счет реакции между изотопом бор-10 и нейтроном. Клинические исследования на ядерных реакторах доказали эффективность данного вида терапии для пациентов с глиомами высокой степени злокачественности. Считается, что широкое внедрение методики в клиническую практику обеспечит компактные источники нейтронов на основе ускорителей заряженных частиц. Во всем мире ведется активная разработка новых ускорительных источников нейтронов, в том числе и в России: в Институте ядерной физики СО РАН был предложен и создан такой источник, на котором в настоящее время проводят доклинические испытания БНЗТ.

Цель исследования – определить цитопатические эффекты БНЗТ на ускорителе эпителиальных нейтронов для культуры клетки глиобластомы человека U87 и выбрать концентрацию препаратов бора, не оказывающую токсического влияния на клетки до облучения *in vitro*. **Материал и методы.** Клетки линии U87 инкубировали с борфенилаланином (BPA) и боркапнатом (BSH) в течение 1, 2 и 10 сут в различных концентрациях. Оценку цитопатических эффектов препаратов бора проводили с помощью МТТ-теста и клоногенного теста. Эффективность БНЗТ на клеточной линии U87 определяли на основании клоногенного теста. **Результаты.** МТТ-тест показал снижение выживаемости клеток при концентрации изотопа бора-10 в среде 160 мкг/мл через 48 ч и 640 мкг/мл через 24 ч инкубации для BPA. Цитопатические эффекты BSH проявляются при концентрации бора 80 мкг/мл после 48-часовой инкубации, а доля выживших клеток снижается до 89 % по сравнению с контролем. Согласно клоногенному тесту, цитотоксические эффекты препаратов BSH и BPA при концентрации бора в среде 40 мкг/мл составили 79,6 и 84 % соответственно. При облучении клеток эпителиальными нейтронами в присутствии BPA доля выживших клеток составила 18 ± 2 %, в присутствии BSH – 13 ± 2 %. Гибель клеток без препаратов бора обусловлена упругим рассеянием нейтронов, ядерными реакциями поглощения тепловых нейтронов водородом и азотом и сопутствующим γ -излучением. **Заключение.** Проведенное исследование наглядно показало уменьшение доли выживших клеток линии U87 после БНЗТ на ускорительном источнике эпителиальных нейтронов в ИЯФ СО РАН в присутствии препаратов BSH и BPA, обогащенных изотопом ¹⁰B.

✉ Бывальцев Вадим Анатольевич, byval75vadim@yandex.ru

Ключевые слова: клеточная линия глиобластомы U87, БНЗТ, ускорительный источник эпителивых нейтронов, препараты бора, МТТ-тест, клоногенный тест, опухоли головного мозга, гибель клетки, лучевая терапия.

CYTOPATHIC EFFECTS OF ACCELERATOR-BASED BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY ON HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS

V.A. Byvaltsev^{1,2,3}, E.L. Zavjalov^{4,5}, V.V. Kanygin⁵, A.I. Kasatova^{1,5}, A.I. Kichigin^{1,5}, I.A. Razumov^{4,5}, T.V. Sycheva^{5,6}, S.Yu. Taskaev^{5,6}

Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia¹

8, 3 Iyulya Street, 664022-Irkutsk, Russia. E-mail: yarullinaai@yahoo.com¹

Railway Clinical Hospital, Irkutsk, Russia²

10, Botkina Street, 664005-Irkutsk, Russia²

Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia³

1, Bortsov Revolutsii Street, 664003-Irkutsk, Russia³

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia⁴

10, Lavrentiev Avenue, 630090-Novosibirsk, Russia⁴

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia⁵

2, Pirogov St., 630090-Novosibirsk, Russia⁵

Budker Institute of Nuclear Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia⁶

10, Lavrentiev Ave., 630090-Novosibirsk, Russia⁶

Abstract

Boron neutron capture therapy (BNCT) is a targeted therapy based on a selective damage to cancer cells due to the interaction between boron-10 isotope and neutron. Reactor-based BNCT has been found to be effective in the treatment of high-grade gliomas. It is believed that compact accelerator-based neutron sources will ensure widespread adoption of the technique in clinical practice. New accelerator-based neutron sources are being actively developed all over the world. At the Institute of Nuclear Physics (Russia), the accelerator-based neutron source was developed for pre-clinical studies of BNCT. **Purpose:** to determine the cytopathic effects of accelerator-based BNCT on the human U87-glioblastoma cell line and to select a concentration of boron drugs that do not have a toxic effect on the cells before irradiation in vitro. **Material and Methods.** To assess the cytopathic effects (MTT test and colony-forming assay) of various concentrations of boron-containing drugs, U87 cells were incubated with boronophenylalanine (BPA) and sodium borocaptate (BSH) for 1, 2 and 10 days. The effect of BNCT on the U87 cell line was determined using colony-forming assay. **Results.** The MTT test showed a decrease in cell survival at a boron-10 isotope concentration of 160 µg/ml after 48 hours and 640 µg/ml after 24 hours of incubation for BPA. The cytopathic effects for sodium BSH appeared at a boron concentration of 80 µg / ml after 48 hours of incubation, and survival fraction of cells was reduced to 89 % compared to the control. According to the colony-forming assay, the cytotoxic effects of BSH and BPA at a boron concentration of 40 µg/ml in the medium were 79.6 and 84 %, respectively. The proportions of surviving cells were 18 ± 2 % and 13 ± 2 % after epidermal neutron irradiation in the presence of boronophenylalanine and in the presence of sodium borocaptate, respectively. Cell death without boron drugs occurred due to the neutron elastic scattering, nuclear reactions of thermal neutron capture by hydrogen and nitrogen, and accompanying gamma radiation. **Conclusion.** The study clearly showed a decrease in the proportion of surviving U87 cells after accelerator-based BNCT in the presence of ¹⁰B-enriched BSH and BPA.

Key words: U87 glioblastoma cell line, BNCT, accelerator based epidermal neutron source, boron drugs, MTT test, colony formation assay, brain tumors, cell death, radiation therapy.

Введение

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) является одной из перспективных методик лечения ряда онкологических заболеваний, в частности злокачественных опухолей головного мозга. Определяющим фактором является возможность селективно уничтожать опухолевые клетки. Основой метода является облучение нейтронами клеток с накопленным изотопом ¹⁰B. В результате поглощения нейтрона бором происходит ядерная реакция, продукты которой, альфа-частица и ядро лития, обладают большой энергией для летального поврежде-

дения ДНК клетки и ее гибели [1]. Считается, что уничтожаться будут только клетки, содержащие ¹⁰B, поскольку длина пробега продуктов распада, альфа-частицы и ядра лития, не превышает размеров клетки. В мировой практике для адресной доставки бора используют два соединения: L-борфенилаланин (BPA) и боркапнат (BSH) [2]. BPA активно транспортируется в опухолевые клетки с помощью L-транспортной системы аминокислот, на фоне повышенной пролиферации и белкового синтеза [3, 4]. Накопление BSH в ткани опухолей головного мозга наблюдается при повреждении

гематоэнцефалического барьера в совокупности с богатым кровоснабжением опухоли [5, 6].

В качестве источников нейтронов для БНЗТ до последнего времени использовались ядерные реакторы. Так, исследования влияния БНЗТ *in vitro* на клеточные линии глиом человека (U87, U251, T98G, SHG44, F98, 9L) показали, что БНЗТ более эффективно подавляет пролиферативную активность и рост исследуемых линий глиом по сравнению со стандартным облучением [1, 7–10].

На ядерных реакторах методикой БНЗТ пролечили чуть более 1500 больных, преимущественно с положительными результатами. Однако широкое внедрение методики БНЗТ в клиническую практику может быть осуществлено только с применением ускорителей заряженных частиц. Кроме того, что ядерный реактор нельзя установить в клинику в центре города, а также того факта, что после аварий в Чернобыле и Фукусиме в массовом сознании сформировалась радиофобия, существенным преимуществом ускорителей для лечения опухолей глубинного залегания является возможность получать терапевтический пучок нейтронов лучшего качества – преимущественно эпитепловых, с меньшим вкладом быстрых и тепловых нейтронов и γ -излучения. В настоящее время в мире разрабатывается несколько источников эпитепловых нейтронов на основе разного типа ускорителей заряженных частиц с использованием бериллиевой или литиевой мишени [11], в том числе источник нейтронов в ИЯФ СО РАН на основе ускорителя-тандема с вакуумной изоляцией и литиевой мишени [12, 13]. На этом источнике проведен ряд исследований по изучению влияния нейтронного излучения на жизнеспособность клеточных культур U251, T98G, СНО-К1, V-79 [14]. Показано, что облучение клеток 4 линий, культивируемых в присутствии ВРА, уменьшает их колониобразующую способность по сравнению с контролем. Также было изучено влияние эпитепловых нейтронов в различных дозах на жизнеспособность опухолевых клеток глиобластомы U87. Увеличение дозы с 1,9 до 4,1 Зв за 2–3 ч облучения способствовало гибели опухолевых клеток [15].

Целью исследования является подбор оптимальной концентрации препаратов бора, не оказывающей токсического влияния на клетки U87 до облучения *in vitro*, с последующей оценкой эффективности БНЗТ на ускорительном источнике.

Материал и методы

Культура клеток глиобластомы человека U87 была получена в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ИЦИГ СО РАН. Клетки культивировались на среде DMEM/F12 (1:1) (Биолот, Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) и гентамицина 50 мкг/мл (Дальхимфарм, Россия) при температуре 37 °С с 5 % CO₂. Клетки куль-

тивировались во флаконах 75 см² и за 2–3 сут до проведения БНЗТ пересевалась на два 6-луночных планшета: в одном находились клетки, которые подвергались облучению, в другом – контрольные образцы без облучения.

Для приготовления раствора ВРА (Katchem, Чехия), обогащенного ¹⁰B, использовалась фруктоза в молярном избытке согласно протоколу Rossini et al. [16]. Концентрация стокового раствора ВРА составила 2,5 мг/мл. BSH (Katchem, Чехия), обогащенный ¹⁰B, был растворен в 0,9 % растворе NaCl. Концентрация стокового раствора BSH составила 1,6 мг/мл.

В логарифмическую фазу роста за 18 ч до облучения в планшеты с клетками были добавлены препараты бора (ВРА и BSH) в концентрации ¹⁰B 40 мкг/мл. Клетки из группы контроля и группы облученного контроля инкубировались без препаратов бора.

По окончании времени инкубации среда с препаратами бора была заменена на среду без препарата. Транспортировка планшетов с клетками на ускоритель нейтронов и обратно осуществлялась в термоизолирующем контейнере, температура в котором находилась в интервале от 18 до 30 °С. Эта процедура была проведена для клеток из всех групп, включая контрольные. Вне условий CO₂ инкубатора клетки находились не более 3 ч. Во время облучения клетки линии U87 опытных и контрольных групп находились в монослое на 6-луночных планшетах.

Облучение проведено на ускорительном источнике эпитепловых нейтронов ИЯФ СО РАН [12] в течение 25 мин при энергии протонов 2 МэВ и токе 2,6 мА. Перед облучением планшет с U87 помещали внутрь фантома из оргстекла на глубину 36 мм от поверхности и ставили под нейтроногенерирующую мишень. Над 6-луночным планшетом располагали золотую активационную фольгу, степень активации которой использовали для контроля поглощенной дозы. Проведенные расчёты показали, что группы БНЗТ с концентрацией ¹⁰B в образцах 40 мкг/мл получили дозу 5,74 Гр экв, облученные образцы без бора – 1,1 Гр экв.

В основе определения цитотоксичности методом МТТ лежит способность митохондриальных ферментов живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза, далее растворимые в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Были оценены ранние (24 и 48 ч) и поздние (10 сут) цитотоксические эффекты БНЗТ в возрастающих концентрациях на клеточную линию U87. Интактные клетки, которые инкубировались без препаратов бора, были приняты за контроль. Клеточная линия высевалась в 96-луночный планшет по 5 × 10³–10⁴ клеток на лунку. Через сутки в разные лунки были добавлены препараты бора в зависи-

мости от группы (BSH или BPA) в концентрациях ^{10}B – 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 мкг/мл по 4 повторения, с которыми клетки инкубировались в двух временных интервалах – 24 и 48 ч. Затем среду с препаратом заменяли на среду без сыворотки и добавляли 10 мкл раствора МТТ (в концентрации 5 мг/мл) в каждую лунку. Клетки инкубировали еще 4 ч и затем среду удаляли и вносили ДМСО по 100 мкл/лунку с последующим ресуспендированием раствора и его инкубацией в течение 5 мин при температуре 37 °С в термостате. После инкубации измеряли оптическую плотность полученного раствора на BioRad iMark Microplate reader при длине волны 490 нм. В качестве нулевого контроля использовали лунки без клеток с раствором ДМСО без добавления МТТ-реагента. По полученным результатам рассчитывали долю выживших клеток и ЛД50-концентрацию препаратов бора, которая вызвала 50 % гибель клеток по сравнению с контролем.

Клоногенный анализ для определения цитотоксичности BPA и BSH и эффективности БНЗТ. В логарифмическую фазу роста клетки U87 пересевали в 6-луночные культуральные планшеты. Через сутки среду меняли на содержащую BPA и BSH и инкубировали в течение 18 ч. Содержание ^{10}B в лунках было равно 10, 20, 40 и 80 мкг/мл, контрольная лунка не содержала препаратов бора. Через 18 ч клетки отмывали, снимали трипсином и высевали по 200 клеток на лунку 12-луночного планшета в 3 повторах. После облучения клетки также высевали по 200 на лунку 12-луночного планшета в 3 повторах и культивировали в CO_2 -инкубаторе. Планшеты инкубировали в CO_2 -инкубаторе и ежедневно контролировали состояние и количество клеток в колониях. На 10-е сут, когда колонии достигли достаточного размера (более 50 клеток), их фиксировали 10 % формалином (Panreac AppliChem, Германия) и окрашивали раствором Гимза (Sigma, США). Эффективность клонирования клеток в контрольной группе составляла 81 и была принята за 100 %. В экспериментальных группах эффективность клонирования определяли как процент от клонирования в контрольной

группе. Подсчет проводился при помощи светового инвертированного микроскопа Zeiss Primo Vert (Германия).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010 и STATISTICA 10. Категориальные переменные выражали в процентах. Сравнительный анализ значений в сравниваемых группах выполняли при помощи Манна – Уитни теста и критерия χ^2 Пирсона. Полученные значения выражали как среднее \pm SD.

Результаты

Определение цитотоксичности BPA и BSH для клеток U87 в МТТ тесте

Впервые цитопатические эффекты BSH проявлялись при концентрации бора 80 мкг/мл только после 48-часовой инкубации, когда доля выживших клеток снижалась до 89 % по сравнению с контролем (Mann – Whitney test: $Z=2,36$, $p=0,018$). Доля выживших клеток при концентрации бора 160 и 320 мкг/мл практически не изменялась: 87,8 % (Mann – Whitney test: $Z=2,85$, $p=0,004$) и 85,9 % (Mann – Whitney test: $Z=2,49$, $p=0,013$) как после 24-часовой инкубации, так и после 48 ч: 87,8% (Mann – Whitney test: $Z=2,85$, $p=0,004$) и 87,1 % (Mann – Whitney test: $Z=2,61$, $p=0,009$) соответственно. Скачкообразное снижение до 50 % наблюдалось только при 640 мкг/мл до 50,2 % для 24-часовой инкубации (Mann – Whitney test: $Z=2,85$, $p=0,004$) и 49,9 % для 48 ч (Mann – Whitney test: $Z=2,85$, $p=0,004$). Далее при 1280 мкг/мл доля выживших клеток снижалась до 33,5 % после 24 ч (Mann – Whitney test: $Z=2,85$, $p=0,004$) и 40,2 % после 48 ч инкубации (Mann – Whitney test: $Z=2,85$, $p=0,004$) (рис. 1).

Иная картина наблюдалась для препарата BPA (рис. 2). Инкубация клеток в течение 24 и 48 ч при концентрации бора в среде 80 мкг/мл не приводила к достоверному снижению выживаемости клеток: 95,8 % (Mann–Whitney test: $Z=1,15$, $p=0,25$) и 95,3 % (Mann – Whitney test: $Z=1,15$, $p=0,25$) соответственно. Достоверное снижение выживаемости клеток наблюдалось при концентрации

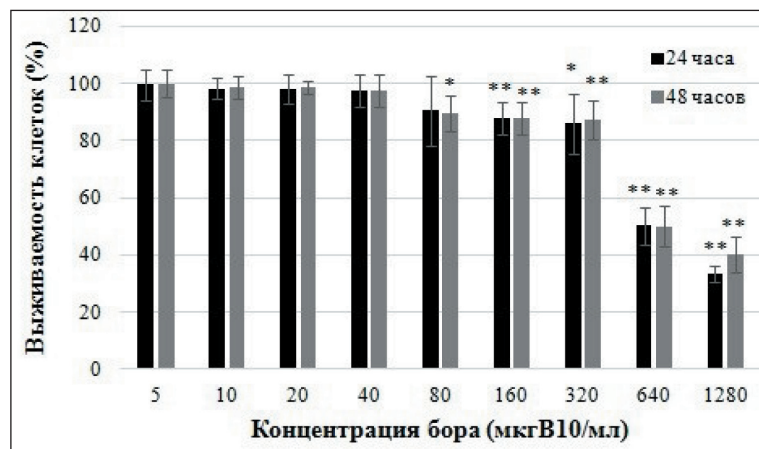


Рис. 1. Определение дозозависимых цитотоксических эффектов BSH при помощи МТТ-теста через 24 и 48 ч с начала инкубации, $\bar{x} \pm \text{SD}$.
Примечание: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$

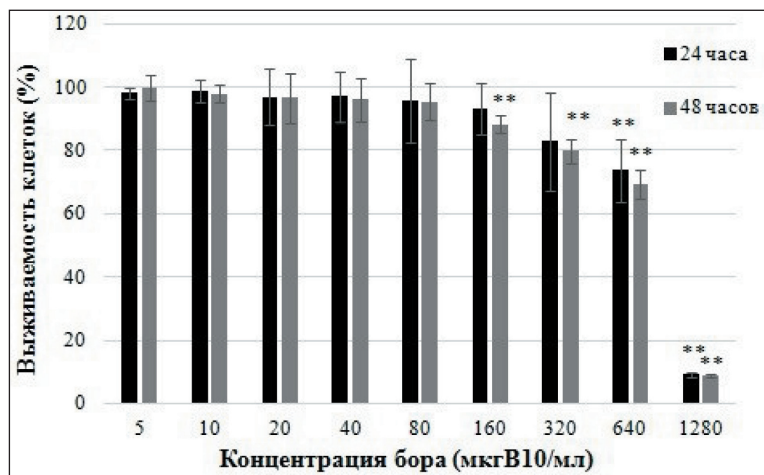


Рис. 2. Определение дозозависимых цитотоксических эффектов ВРА при помощи МТТ-теста через 24 и 48 ч с начала инкубации, $x \pm SD$.
Примечание: ** – $p \leq 0,01$

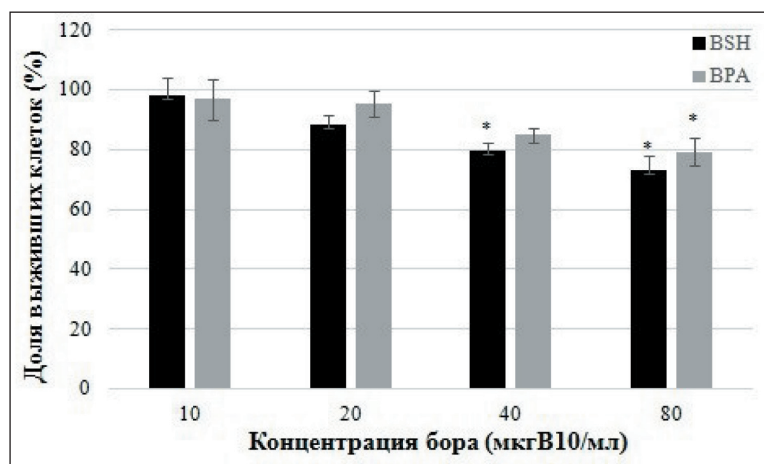


Рис. 3. Определение при помощи клоногенного теста поздних цитотоксических эффектов BSH и ВРА на 10-е сут при разных концентрациях боросодержащих препаратов в среде.
Примечание: * – $p \leq 0,05$

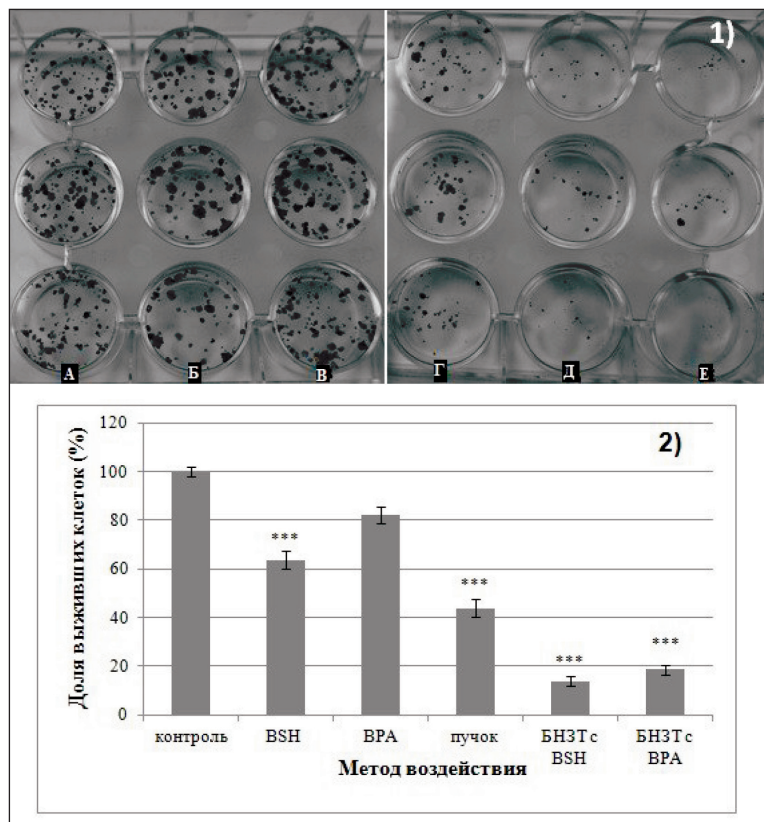


Рис. 4. Эффекты БНЗТ на клетки глиобластомы человека U87:
1) Фотографии лунок с колониями клеток U87, окрашенными раствором Гимза в различных группах. **Необлученный контроль:** А – клетки U87 без инкубации с препаратами бора, Б – клетки U87, инкубированные с BSH, В – клетки U87, инкубированные с ВРА.
Облученные группы: Г – клетки линии U87 без препаратов бора, Д – клетки U87, инкубированные с ВРА, Е – клетки U87, инкубированные с BSH;
2) Определение при помощи клоногенного анализа эффективности выживания клеток линии U87 после различных вариантов воздействия.
Примечание: *** – $p \leq 0,001$

изотопа бора в среде 160 мкг/мл и 320 через 48 ч инкубации (Mann – Whitney test: $Z=2,85$, $p=0,004$ и $Z=2,85$, $p=0,004$ соответственно). Причем в отличие от BSH, при 640 мкг/мл выживаемость клеток незначительно снижалась – до 73,7 % (Mann – Whitney test: $Z=2,85$, $p=0,004$) для 24 ч и 69,3 % (Mann – Whitney test: $Z=2,85$, $p=0,004$) для 48 ч инкубации. Тогда как при концентрации бора 1280 мкг/мл выживаемость резко снижалась – до 9,1 % (Mann – Whitney test: $Z=2,85$, $p=0,004$) для 24 ч и 8,7 % (Mann – Whitney test: $Z=2,85$, $p=0,004$) для 48 ч инкубации.

Определение цитотоксичности ВРА и BSH при помощи клоногенного теста

Оба исследуемых вещества оказывали значительное воздействие на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток глиобластомы U87 (рис. 3). В концентрации ^{10}B 40 мкг/мл доля выживших клеток составила 79,6 % для BSH ($\chi^2=4,16$, $p=0,0414$) и 84,9 % для ВРА ($\chi^2=2,13$, $p=0,1385$), тогда как при самой высокой используемой концентрации бора в инкубационной среде (80 мкг/мл) при инкубации с BSH количество колоний снижалось до 73 % ($\chi^2=7,6$, $p=0,0058$), а с ВРА – до 79,2 % ($\chi^2=4,37$, $p=0,0373$).

Оценка эффектов БНЗТ на клетки U87 при помощи клоногенного теста

После облучения клеток глиобластомы эпителиальными нейтронами, поглощенная доза для которых была равна 5,74 Гр, доля выживших клеток через 24 ч после облучения составила $43 \pm 3,7$ % (рис. 4 А,Б). При облучении клеток эпителиальными нейтронами доля выживших клеток, предварительно проинкубированных с ВРА при концентрации бора в среде 40 мкг/мл, снизилась более чем в 2 раза и составила 18 ± 2 % ($\chi^2=18,17$, $p=0$). Аналогичная ситуация наблюдалась при облучении клеток U87, которые предварительно инкубировались с BSH: 13 ± 2 % ($\chi^2=21,54$, $p=0$). Цитотоксические эффекты препаратов BSH и ВРА при концентрации бора в среде 40 мкг/мл в этом эксперименте составили 63,7 % ($\chi^2=13,91$, $p=0,0002$) и 82,1 % ($\chi^2=2,76$, $p=0,097$) соответственно.

Обсуждение

Многие исследования подтверждают высокую эффективность БНЗТ в отношении глиобластомы человека, когда стандартные методы лучевой терапии не дают терапевтического эффекта [17–19]. Несмотря на успешные результаты, БНЗТ остается экспериментальным методом лечения. В первую очередь это обусловлено отсутствием безопасного и доступного источника нейтронов с требуемыми характеристиками. Второй причиной невозможности введения этого подхода в широкую медицинскую практику является недостаточная селективность накапливающихся в опухоли препаратов бора, а также их токсичность. Поиск новых и безопасных источников нейтронов привел к

созданию компактной установки ускорительного типа, конструктивные возможности которой позволяют надеяться, что она будет применяться в клинической практике [20]. В отношении препаратов бора проводятся исследования от определения оптимальных терапевтических концентраций до разработки новых способов их доставки в опухолевые клетки [11].

Для оценки эффектов БНЗТ, особенно при исследованиях *in vitro*, в первую очередь необходима оценка цитотоксического эффекта препарата бора. Так, мы уже оценили ранее максимально нетоксичные концентрации ВРА на линию U251, используя МТТ-тест. Самая низкая токсичность наблюдалась в диапазоне от 10 до 40 мкг ^{10}B /мл, самый низкий уровень пролиферации составил 84 % при максимальной концентрации бора 320 мкг/мл [21]. Цитотоксичность ВРА была также оценена на опухолевых линиях D384 (астроцитомы), SH-SY5Y (нейробластома) и фибробластах F26: через 24 ч были отмечены дозозависимые цитотоксические эффекты, начиная с концентрации 40 мкг ^{10}B /мл, на опухолевые клетки, в то время как в группе фибробластов жизнеспособность снизилась лишь при инкубации с ВРА в течение 48 ч в концентрации 100 мкг ^{10}B /мл. Клоногенный тест также выявил дозозависимое уменьшение размера и количества колоний в сравнении с контролем [21]. Некоторые авторы также использовали клоногенный анализ для определения токсичности препаратов бора: сравнительный анализ группы с добавлением ВРА в концентрации 100 ppm относительно интактного контроля не выявил достоверных различий [14]. Проведенные ранее исследования по оценке цитотоксичности наиболее широко используемых для БНЗТ препаратов BSH и ВРА на различных клеточных линиях [21, 22] во многом совпадают с нашим исследованием.

Однако дозозависимых исследований на установке ускорительного типа до сих пор не проводилось. В представленном исследовании мы постарались наиболее широко определить дозозависимые эффекты цитотоксичности препаратов BSH и ВРА, для чего исследовали не только их влияние на функцию митохондрий с помощью МТТ-теста, но и на репродуктивную функцию с помощью клоногенного теста. Наше исследование также подчеркивает важность оценки эффектов от длительного воздействия препаратов. Так, было выявлено, что препараты BSH и ВРА оказывают цитотоксический эффект при длительном воздействии в высоких концентрациях. Токсические эффекты были отмечены уже для 80 мкг ^{10}B /мл в МТТ-тесте при инкубации с BSH и 160 мкг ^{10}B /мл с ВРА, в клоногенном тесте концентрации 40 и 80 мкг ^{10}B /мл достоверно ингибируют процесс колониеобразования. Полученные различия объясняются тем, что клоногенный тест является более чувствительным, так как оценивает долгосрочные

эффекты воздействия препаратов на репродуктивную функцию клетки. Действительно, по данным ряда авторов, концентрация 40 мкг¹⁰В/мл считается эффективной для БНЗТ [14, 23]. Некоторые авторы используют меньшие концентрации бора для проведения БНЗТ: японские исследователи инкубировали культуру U87 с 20 мкг¹⁰В/мл в течение 24 ч с последующим облучением на реакторе JRR-4. В качестве доставщиков бора применяли BSH и новые препараты [24]. Coderre et al. в эксперименте на крысиной глиосаркоме использовали BSH, ВРА и борную кислоту, когда концентрация бора в среде составила около 25 мкг¹⁰В/мл [9].

Поскольку концентрация 40 мкг¹⁰В/мл борсодержащего препарата была определена как минимально токсическая доза, ее далее использовали для проведения БНЗТ. Время инкубации с препаратами бора перед БНЗТ было выбрано исходя из данных литературных источников. Максимальное накопление ВРА клетками достигается через 4 ч и незначительно увеличивается через 24 ч после начала инкубации [25]. Однако концентрация бора во время инкубации с BSH остается неизменной, вероятно, вследствие накопления препарата путем пассивной диффузии [24], поэтому время инкубации не является значимым параметром для BSH.

Проведенные нами эксперименты по облучению клеточной культуры линии U87 на ускорительном источнике эпитепловых нейтронов в ИЯФ СО РАН показали достоверное уменьшение жизнеспособно-

сти клеток, инкубированных с ВРА или BSH, более чем на 90 % популяции в сравнении с контрольной группой. Однако отмечено, что в контрольной группе, где проводилось облучение потоком нейтронов без добавления препарата бора, выживаемость клеток снизилась более чем на 50 %. Гибель клеток обусловлена упругим рассеянием нейтронов, преимущественно быстрых, на ядрах вещества, ядерными реакциями поглощения тепловых нейтронов ядрами водорода и азота и сопутствующим γ -излучением. Полученные в исследовании данные актуализируют необходимость радиобиологической оценки воздействия пучка. В целом результаты, полученные на ускорительном источнике, сопоставимы или во многом коррелируют с результатами проведенных *in vitro* исследований по БНЗТ глиальных опухолей на реакторах [7–10].

Заключение

Проведенное исследование наглядно показало уменьшение жизнеспособности клеток линии U87 при проведении БНЗТ на ускорительном источнике эпитепловых нейтронов в ИЯФ СО РАН в присутствии препаратов BSH и ВРА, обогащенных ¹⁰B. Нами не было выявлено выраженных цитотоксических эффектов этих препаратов в концентрации 40 мкг¹⁰В/мл. Отмеченная при облучении гибель клеток без препаратов бора обусловлена упругим рассеянием нейтронов, ядерными реакциями поглощения тепловых нейтронов водородом и азотом и сопутствующим γ -излучением.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Sauerwein W, Wittig A, Moss R, Nakagawa Y. Neutron Capture Therapy: Principles and Applications. Springer, 2012. 533.
2. Barth R.F., Zhang Z., Liu T. A realistic appraisal of boron neutron capture therapy as a cancer treatment modality. *Cancer Commun (Lond)*. 2018 Jun 19; 38(1): 36. doi: 10.1186/s40880-018-0280-5.
3. Sun T., Zhang Z., Li B., Chen G., Xie X., Wei Y., Wu J., Zhou Y., Du Z. Boron neutron capture therapy induces cell cycle arrest and cell apoptosis of glioma stem/progenitor cells *in vitro*. *Radiat Oncol*. 2013 Aug 6; 8(1): 195. doi: 10.1186/1748-717X-8-195.
4. Kubota R., Yamada S., Ishiwata K., Tada M., Ido T., Kubota K. Cellular accumulation of 18F-labelled boronophenylalanine depending on DNA synthesis and melanin incorporation: a double-tracer microautoradiographic study of B16 melanomas *in vivo*. *Br J Cancer*. 1993 Apr; 67(4): 701–705. doi: 10.1038/bjc.1993.129
5. Yang F.Y., Chen Y.W., Chou F.I., Yen S.H., Lin Y.L., Wong T.T. Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: enhanced drug delivery and antitumor effect following blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound. *Future Oncol*. 2012; 8(10): 1361–1369. doi: 10.2217/fon.12.118.
6. Barth R.F., Yang W., Rotaru J.H., Moeschberger M.L., Boesel C.P., Soloway A.H., Joel D.D., Nawrocky M.M., Ono K., Goodman J.H. Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival following intracarotid injection of sodium borocaptate with or without blood-brain barrier disruption. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1997 July; 37(3): 663–72. doi: 10.1016/S0360-3016(00)00421-1.
7. Wang P., Zhen H., Jiang X., Zhang W., Cheng X., Guo G., Mao X., Zhang X. Boron neutron capture therapy induces apoptosis of glioma cells through Bcl-2/Bax. *BMC Cancer*. 2010 Dec 2; 10: 661. doi: 10.1186/1471-2407-10-661.
8. Kinashi Y., Okumura K., Kubota Y., Kitajima E., Okayasu R., Ono K., Takahashi S. Dose-rate effect was observed in T98G glioma cells following BNCT. *Appl Radiat Isot*. 2014 Jun; 88: 81–85. doi: 10.1016/j.apradiso.2013.11.117.
9. Таскаев С.Ю., Каныгин В.В. Бор-нейтронозахватная терапия. Новосибирск, 2016. 216. [Taskaev S.Yu., Kanygin V.V. Boron Neutron Capture Therapy. Novosibirsk, 2016. 216. (in Russian)].

10. Таскаев С.Ю. Ускорительный источник эпитепловых нейтронов. Физика элементарных частиц и атомного ядра. 2015; 46(16): 1770–1830. [Taskaev S.Yu. Accelerating source of epithermal neutrons. *Physics of Elementary Particles and Atomic Nuclei*. 2015; 46(16): 1770–1830. (in Russian)].
11. Byvaltsev V., Kanygin V., Belykh E., Taskaev S. Prospects in Boron Neutron Capture Therapy of Brain Tumors. *World Neurosurg*. 2012 Jul; 78(1–2): 8–9. doi: 10.1016/j.wneu.2012.05.026.
12. Волкова О.Ю., Мечетина Л.В., Таранин А.В., Заборонок А.А., Nakai K., Лежнин С.И., Фролов С.А., Касатов Д.А., Макаров А.Н., Сорокин И.Н., Сычева Т.В., Щудло И.М., Таскаев С.Ю. Влияние нейтронного излучения на жизнеспособность опухолевых клеток, культивируемых в присутствии изотопа бора ¹⁰B. *Вестник радиологии и радиологии*. 2016; 97(5): 283–8. [Volkova O.Yu., Mechetina L.V., Taranin A.V., Zaboronok A.A., Nakai K., Lezhnin S.I., Frolov S.A., Kasatov D.A., Makarov A.N., Sorokin I.N., Sycheva T.V., Shchudlo I.M., Taskaev S.Yu. Impact of neutron radiation on the viability of tumor cells cultured in the presence of boron-10 isotope. *Journal of radiology and nuclear medicine*. 2016; 97(5): 283–8. (in Russian)]. doi: 10.20862/0042-4676-2016-97-5-283-288.
13. Sato E., Zaboronok A., Yamamoto T., Nakai K., Taskaev S., Volkova O., Mechetina L., Taranin A., Kanygin V., Isobe T., Mathis B.J., Matsumura A. Radiobiological response of U251MG, CHO-K1 and V79 cell lines to accelerator-based boron neutron capture therapy. *J Radiat Res*. 2018; 59(2): 101–107. doi: 10.1093/jrr/rrx071.
14. Mostovich L.A., Gubanova N.V., Kutsenko O.S., Aleinik V.I., Kuznetsov A.S., Makarov A.N., Soroki I.N., Taskaev S.Yu., Nepomnyashchikh G.I., Grigor'eva E.V. Effect of Epithermal Neutrons on Viability of Glioblastoma Tumor Cells *in Vitro*. *Bulletin of Experimental Biology & Medicine*. 2011; 151(2): 264–267. doi: 10.1007/s10517-011-1304-1.
15. Rossini A.E., Dagrosa M.A., Portu A., Saint Martin G., Thorp S., Casal M., Navarro A., Juvenal G.J., Pisarev M.A. Assessment of biological effectiveness of boron neutron capture therapy in primary and metastatic melanoma cell lines. *Int J Radiat Biol*. 2015; 91(1): 81–9. doi: 10.3109/09553002.2014.942013.
16. Yamamoto T., Nakai K., Tsurubuchi T., Matsuda M., Shirakawa M., Zaboronok A., Endo K., Matsumura A. Boron neutron capture therapy for

- newly diagnosed glioblastoma: a pilot study in Tsukuba. *Appl Radiat Isot.* 2009 Jul; 67(7–8 Suppl): S25–6. doi: 10.1016/j.apradiso.2009.03.011.
17. Seki K., Kinashi Y., Takahashi S. Influence of p53 status on the effects of boron neutron capture therapy in glioblastoma. *Anticancer Res.* 2015; 35(1): 169–74. doi: 10.1186/1748-717X-8-280.
18. Barth R.F., Vicente M.G., Harling O.K., Kiger W.S., Riley K.J., Binns P.J., Wagner F.M., Suzuki M., Aihara T., Kato I., Kawabata S. Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer. *Radiat Oncol.* 2012; 7: 146. doi: 10.1186/1748-717X-7-146.
19. Shchudlo I., Taskaev S., Kasatov D., Dokutovich V., Makarov A., Sorokin I., Kolesnikov Ya., Sokolova E., Kuznetsov A., Ostreynov Yu. Three-fold increase of the proton beam current in the vacuum insulation tandem accelerator. 7th International Particle Accelerator Conference; 2016 May 8–13; Busan. Korea: TUPMR003; 2016. 12281229. doi: 10.1088/1748-0221/9/12/P12016.
20. Zaboronok A., Byvaltsev V., Kanygin V., Iarullina A., Kichigin A., Taranin A., Volkova O., Mechetina L., Taskaev S., Muhamadiyarov R., Zavyalov E., Nakai K., Sato E., Yamamoto T., Mathis B., Matsumura A. Boron-neutron capture therapy in Russia: preclinical evaluation of efficacy and perspectives of its application in neurooncology. *New Armenian Medical Journal.* 2017; 11(1): 6–15. doi: 10.18632/oncotarget.24078.
21. De Simone U., Manzo L., Ferrari C., Bakeine J., Locatelli C., Coccini T. Short and long-term exposure of CNS cell lines to BPA-f a radiosensitizer for boron neutron capture therapy: safety dose evaluation by a battery of cytotoxicity tests. *Neurotoxicology.* 2013; 35: 84–90. doi: 10.12691/ajn-3-2-1.
22. Doi A., Kawabata S., Iida K., Yokoyama K., Kajimoto Y., Kuroiwa T., Shirakawa T., Kirihata M., Kasaoka S., Maruyama K., Kumada H., Sakurai Y., Masunaga S., Ono K., Miyatake S. Tumor-specific targeting of sodium borocaptate (BSH) to malignant glioma by transferrin-PEG liposomes: a modality for boron neutron capture therapy. *J Neurooncol.* 2008 May; 87(3): 287–94. doi: 10.1007/s11060-008-9522-8.
23. Carpano M., Perona M., Rodriguez C., Nievas S., Olivera M., Santa Cruz G.A., Brandizzi D., Cabrini R., Pisarev M., Juvenal G.J., Dagrosa M.A. Experimental Studies of Boronophenylalanine ((10)BPA) Biodistribution for the Individual Application of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for Malignant Melanoma Treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015 Oct 1; 93(2): 344–52. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.05.039.
24. Coderre J.A., Makar M.S., Micca P.L., Nawrocky M.M., Liu H.B., Joel D.D., Slatkin D.N., Amols H.I. Derivations of relative biological effectiveness for the high-LET radiations produced during boron neutron capture irradiations of the 9L rat gliosarcoma in vitro and in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993 Dec 1; 27(5): 1121–9.
25. Menichetti L., Gaetano L., Zampolli A., Del Turco S., Ferrari C., Bortolussi S., Stella S., Altieri S., Salvadori P.A., Cionini L. In vitro neutron irradiation of glioma and endothelial cultured cells. *Appl Radiat Isot.* 2009; 67(7–8 Suppl): S336–40. doi: 10.1016/j.apradiso.2009.03.058.

Поступила/Received 04.12.18
Принята в печать/Accepted 24.12.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бывальцев Вадим Анатольевич, доктор медицинских наук, заведующий курсом нейрохирургии, Иркутский государственный медицинский университет; главный нейрохирург, «ОАО РЖД»; руководитель центра нейрохирургии, НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский»; заведующий научно-клиническим отделом нейрохирургии, Иркутский научный центр хирургии и травматологии; профессор кафедры травматологии, ортопедии и нейрохирургии, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования (г. Иркутск, Россия). E-mail: byval75vadim@yandex.ru. SPIN-код: 5996-6477. ORCID: 0000-0003-4349-7101. Researcher ID (WOS): D-1962-2018. Author ID (Scopus): 25421197400.

Завьялов Евгений Леонидович, кандидат биологических наук, заведующий ЦКП «SPF»-виварий, старший научный сотрудник лаборатории МБП БНЗТ, Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск, Россия). E-mail: zavjalov@bionet.nsc.ru. ORCID: 0000-0002-9412-3874. AuthorID (РИНЦ): 109999.

Каныгин Владимир Владимирович, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией МБП БНЗТ, Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск, Россия). E-mail: kanigin@mail.ru. SPIN-код: 4211-2417. Author ID (Scopus): 54408472800.

Касатова Анна Исмагиловна, аспирант кафедры нейрохирургии, Иркутский государственный медицинский университет (г. Иркутск, Россия); младший научный сотрудник лаборатории МБП БНЗТ, Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск, Россия). E-mail: yarullinaai@yahoo.com. SPIN-код: 4452-1477. AuthorID (РИНЦ): 870677.

Кичигин Александр Иванович, аспирант кафедры нейрохирургии, Иркутский государственный медицинский университет (г. Иркутск, Россия); младший научный сотрудник лаборатории МБП БНЗТ НГУ (г. Новосибирск, Россия). E-mail: sam@211.ru. SPIN-код: 4321-2422. ORCID: 0000-0001-8763-2905. Researcher ID (WOS): N-7302-2017. Author ID (Scopus): 57189322552.

Разумов Иван Алексеевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов, Институт цитологии и генетики СО РАН; старший научный сотрудник лаборатории МБП БНЗТ, Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск, Россия). E-mail: razumov@bionet.nsc.ru. SPIN-код: 6537-9019. AuthorID (РИНЦ): 81156.

Сычева Татьяна Викторовна, инженер-исследователь лаборатории БНЗТ, Институт ядерной физики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). E-mail: sychevatatyanav@gmail.com. ORCID: 0000-0002-7613-9952.

Таскаев Сергей Юрьевич, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, Институт ядерной физики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). E-mail: taskaev@inp.nsk.su. SPIN-код: 7717-9560. ORCID: 0000-0002-5313-2563. Researcher ID (WOS): D-8479-2016. AuthorID (РИНЦ): 22300.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ (№ 18-29-01007).

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность А.Н. Макарову, И.М. Щудло, Д.А. Касатову, Я.А. Колесникову, Е.О. Соколовой, А.М. Кошкареву, Т.А. Быкову за обеспечение генерации нейтронов.

ABOUT THE AUTHORS

Vadim A. Byvaltsev, MD, DSc, Head Neurosurgery Department, Irkutsk State Medical University; Head of Neurosurgery Center of Road Clinical Hospital, Head of Neurosurgery Department of Irkutsk Surgery and Traumatology Center; Professor of the Department of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education (Irkutsk, Russia). E-mail: byval75vadim@yandex.ru. ORCID: 0000-0003-4349-7101. Researcher ID (WOS): D-1962-2018. Author ID (Scopus): 25421197400.

Evgeniy L. Zavjalov, PhD, Head of Center for Collective Usage «SPF»- vivarium, Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Senior Researcher, Laboratory of Medical and Biological Problems of Boron Neutron Capture Therapy, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0002-9412-3874.

Vladimir V. Kanygin, PhD, Head of Laboratory of Medical and Biological Problems of Boron Neutron Capture Therapy, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 54408472800.

Anna I. Kasatova, MD, Postgraduate, Neurosurgery Department, Irkutsk State Medical University (Irkutsk, Russia); Junior Researcher, Laboratory of Medical and Biological Problems of Boron Neutron Capture Therapy, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia).

Alexander I. Kichigin, MD, Postgraduate, Neurosurgery Department, Irkutsk State Medical University (Irkutsk, Russia), Junior Research Associate, Laboratory of Medical and Biological Problems of Boron Neutron Capture Therapy, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0001-8763-2905. Researcher ID (WOS): N-7302-2017. Author ID (Scopus): 57189322552.

Ivan A. Razumov, DSc, Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Pathological Processes, Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Senior Research Associate, Laboratory of Medical and Biological Problems of Boron Neutron Capture Therapy, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia).

Tatiana V. Sycheva, Experimental Engineer, Laboratory Boron Neutron Capture Therapy, Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS (Novosibirsk, Russia). E-mail: sychevatatyanav@gmail.com. ORCID: 0000-0002-7613-9952.

Sergey Yu. Taskaev, DSc, Leading Research Associate, Laboratory Boron Neutron Capture Therapy, Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0002-5313-2563. Researcher ID (WOS): D-8479-2016.

Funding

The study was supported by Russian Foundation for Basic Research grant (No. 18-29-01007).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to A.N. Makarov, I.M. Schudlo, D.A. Kasatov, Ya.A. Kolesnikov, E.O. Sokolova, A.M. Koshkarev, T.A. Bykov for the generation of neutrons.