

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ-МАРКЕРОВ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК Kim1 И NGAL ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ВЫСОКИХ ДОЗ ЛИТИЯ КАРБОНАТА У МЫШЕЙ С ИМПЛАНТИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ B16

Ю.С.Таскаева^{1,2}, А.И.Касатова², А.Ю.Шатрук¹,
С.Ю.Таскаев², Н.П.Бгатова¹

¹НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, РФ; ²ФГБУ Институт ядерной физики им. Г.И.Будкера СО РАН, Новосибирск, Россия

Оценивали экспрессию белков-маркеров острого повреждения почек при введении высоких доз лития карбоната для определения возможности использования лития в нейтронозахватной терапии. С помощью иммуногистохимии оценивали уровни экспрессии белков Kim1 и NGAL в почках мышей с имплантированной меланомой кожи B16 через 15, 30, 90, 180 мин и 7 сут после введения карбоната лития в дозах 300 и 400 мг/кг *per os*. Было установлено повышение экспрессии исследуемых белков в группе мышей, получавших литий в дозе 400 мг/кг, через 30 и 90 мин, однако через 7 сут после приёма препарата отмечалось её снижение до значений контрольной группы. Можно предположить, что однократное введение лития карбоната в исследованных дозах, эффективных для проведения литий-нейтронозахватной терапии, существенно не повлияет на функцию почек.

Ключевые слова: лития карбонат; острое повреждение почек; Kim1; NGAL; нейтронозахватная терапия

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) — это бинарный метод лучевой терапии рака, основанный на взаимодействии нерадиоактивного изотопа ¹⁰B и теплового нейтрона. Поглощение нейтрона бором приводит к ядерной реакции ¹⁰B(n,α)⁷Li [1], и выделение 84% энергии в результате данной реакции ограничивается размером одной клетки. Таким образом, селективное накопление бора-10 внутри клеток опухоли и последующее облучение нейтронами должно приводить к разрушению клеток опухоли с относительно малыми повреждениями окружающих здоровых клеток. Несмотря на многообещающие результаты клинических исследова-

ний БНЗТ, существует ряд ограничений для широкого использования данной технологии в клинической практике [2,3]. Достижение оптимальных концентраций бора в опухолевых клетках, нормальных тканях и крови является важнейшей задачей БНЗТ [3,4]. В настоящее время, несмотря на разработку новых препаратов адресной доставки бора, в клинических испытаниях используются только препараты бора 2-го поколения, такие как борфенилаланин и борокапнат натрия [5,6].

Использование лития вместо бора может стать новым, перспективным вектором развития нейтронозахватной терапии. Литий обладает рядом физических характеристик, которые могут обеспечить большое сечение поглощения тепловых нейтронов (940 барн) [1] и 100% локальное энерговыделение внутри клетки за счёт

Адрес для корреспонденции: taskaeva.iuliia@gmail.com.
Таскаева Ю.С.

DOI 10.47056/0365-9615-2023-176-11-579-584

высокой линейной передачи энергии продуктов реакции. Использование большинства изотопов с сечением поглощения тепловых нейтронов более 500 барн (таких как ^{113}Cd , ^{135}Xe , ^{149}Sm , ^{151}Eu , Gd и некоторых других), в отличие от лития, приведёт к (n, γ)-реакции и отсутствию локальности выделения энергии.

В настоящее время для лечения биполярных расстройств широко используются соли лития,

в частности лития карбонат (ЛК) [7,8]. При приёме препаратов лития высока вероятность развития побочных эффектов (нефротоксичность) [9].

Целью данной работы являлась оценка экспрессии белков-маркеров острого повреждения почек при введении высоких доз ЛК для определения возможности использования лития в нейтронозахватной терапии.

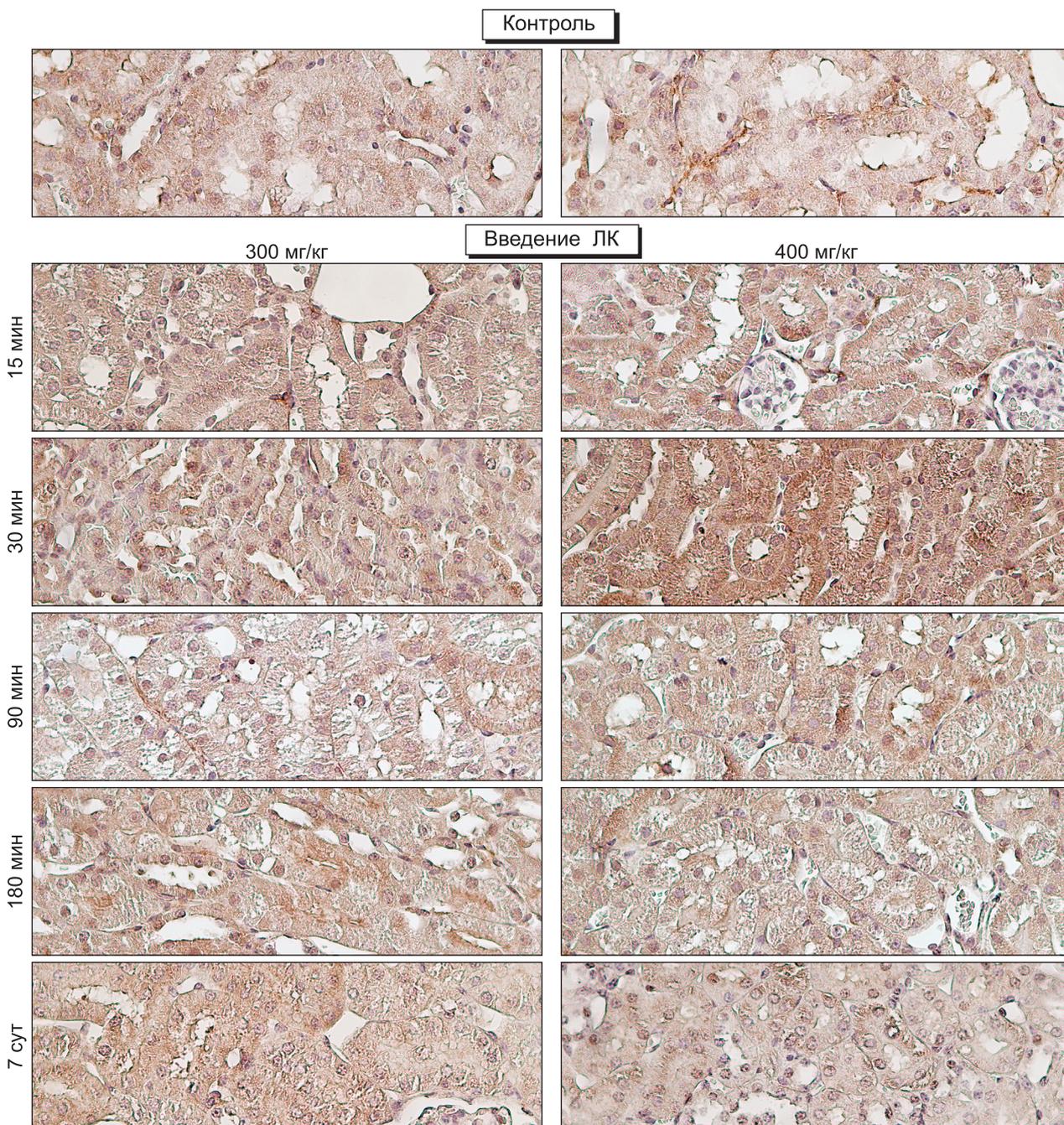


Рис. 1. Иммуногистохимическое окрашивание срезов почки на маркер острого повреждения Kim1 через 15, 30, 90, 180 мин и 7 сут после перорального введения ЛК (в дозах 300 и 400 мг/кг), $\times 400$.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали клеточную культуру меланомы кожи мыши B16, полученную в Институте цитологии и генетики СО РАН, и мышей-самцов линии C57BL/6 массой 20-22 г в возрасте 10-12 нед. Для моделирования опухолевого процесса животным имплантировали клетки (10^6) меланомы кожи мыши B16 подкожно в паховую область, после чего животных распределяли на группы (контрольную и 10 экспериментальных, $n=5$ в каждой группе) в зависимости от вводимой дозы ЛК (300 или 400 мг/кг) и срока забора материала (15, 30, 90, 180 мин и 7 сут). ЛК вводили *per os*, в 30 мкл физиологического раствора NaCl однократно. Животных выводили из эксперимента методом краниоцервикальной дислокации и проводили отбор материала (почки) для исследования. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН (Протокол № 156 от 27 февраля 2020 г.).

Для иммуногистохимического исследования парафиновые срезы почки депарафинировали в серии спиртов понижающей концентрации, регидратировали и подвергали процедуре раскрытия антигена в микроволновой печи в растворе цитратного буфера pH 6.0. После блокировки неспецифического связывания срезы гибридизовали с первичными кроличьими поликлональными антителами к NGAL (Cloud-clone corp.) и к Kim1 (Cloud-clone corp.) в течение ночи при 4°C и далее с соответствующими вторичными поликлональными антителами козла к IgG кролика (Abcam), конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 1 ч при 25°C. После гибридизации срезы отмывали, контрастировали раствором гематоксилина, дегидратировали и заключали в монтирующую среду. Изображения получали на микроскопе AxioScore.A1 (Zeiss) с использованием CCD камеры AxioCam 512 color (Zeiss) и программного обеспечения ZEN 2.3 (Zeiss) ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

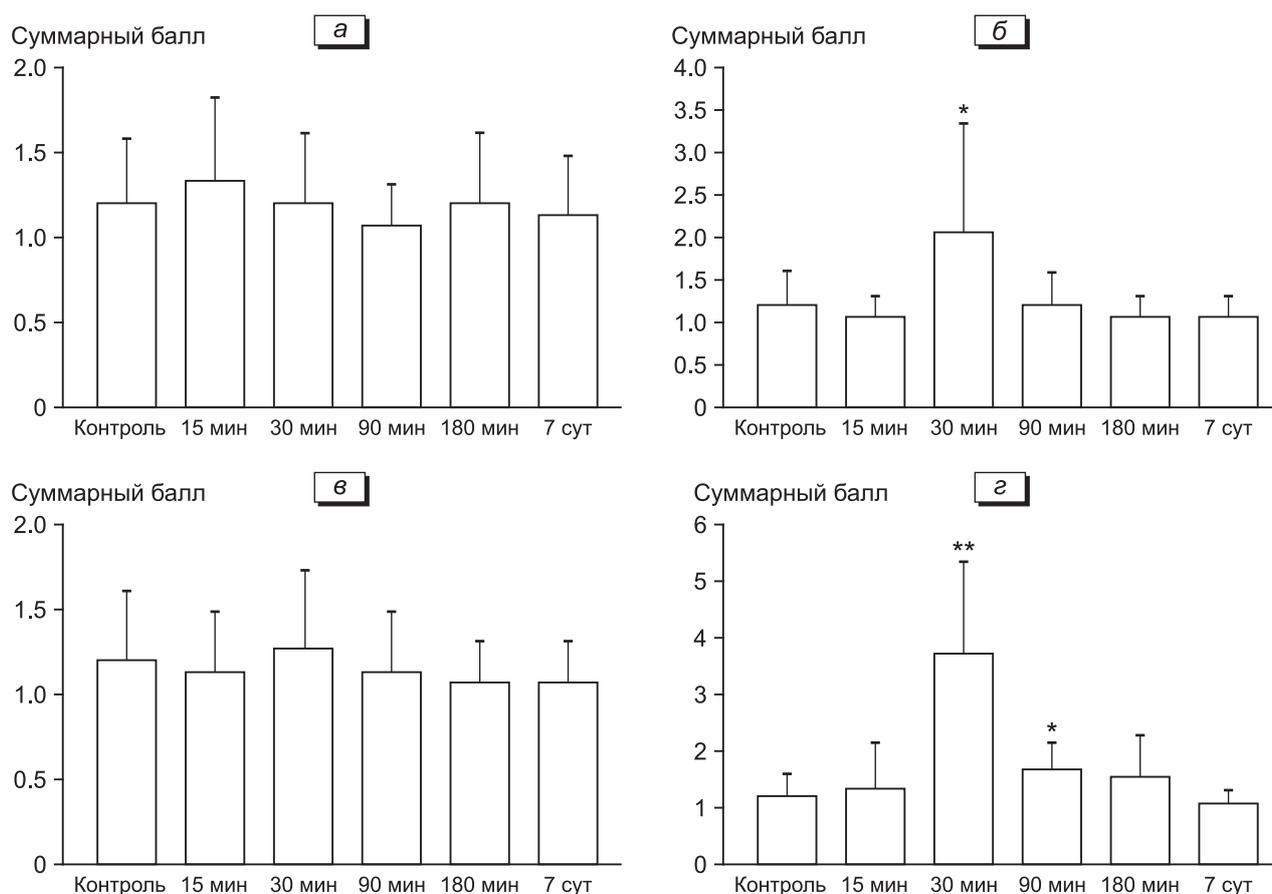


Рис. 2. Оценка результатов иммуногистохимического окрашивания срезов почки на маркеры острого повреждения Kim1 (а, б) и NGAL (в, г) после перорального введения ЛК в дозах 300 мг/кг (а, в) и 400 мг/кг (б, г).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.0005$ по сравнению с контролем.

Морфометрию цифровых изображений (10-15 полей зрения/группа), полученных в результате иммуногистохимического окрашивания, проводили с помощью программного обеспечения ImageJ (НИН). Окрашенные срезы почки оценивали с помощью иммунореактивной шкалы, как описано ранее [10]. Интенсивность и процент положительного окрашивания цитоплазмы оценивали по балльной системе. Площадь окрашивания: 0 (<1%), 1 (1-25%), 2 (>25-50%),

3 (>50-75%) или 4 (>75%) балла. Интенсивность окрашивания: 0 (отсутствие окрашивания), 1 (слабое), 2 (умеренное) или 3 (сильное) балла. Суммарный балл экспрессии Kim1 и NGAL рассчитывали по формуле: площадь×интенсивность окрашивания.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программах Microsoft Excel (Microsoft Corp.) и Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Вычисляли среднее значение (M) и

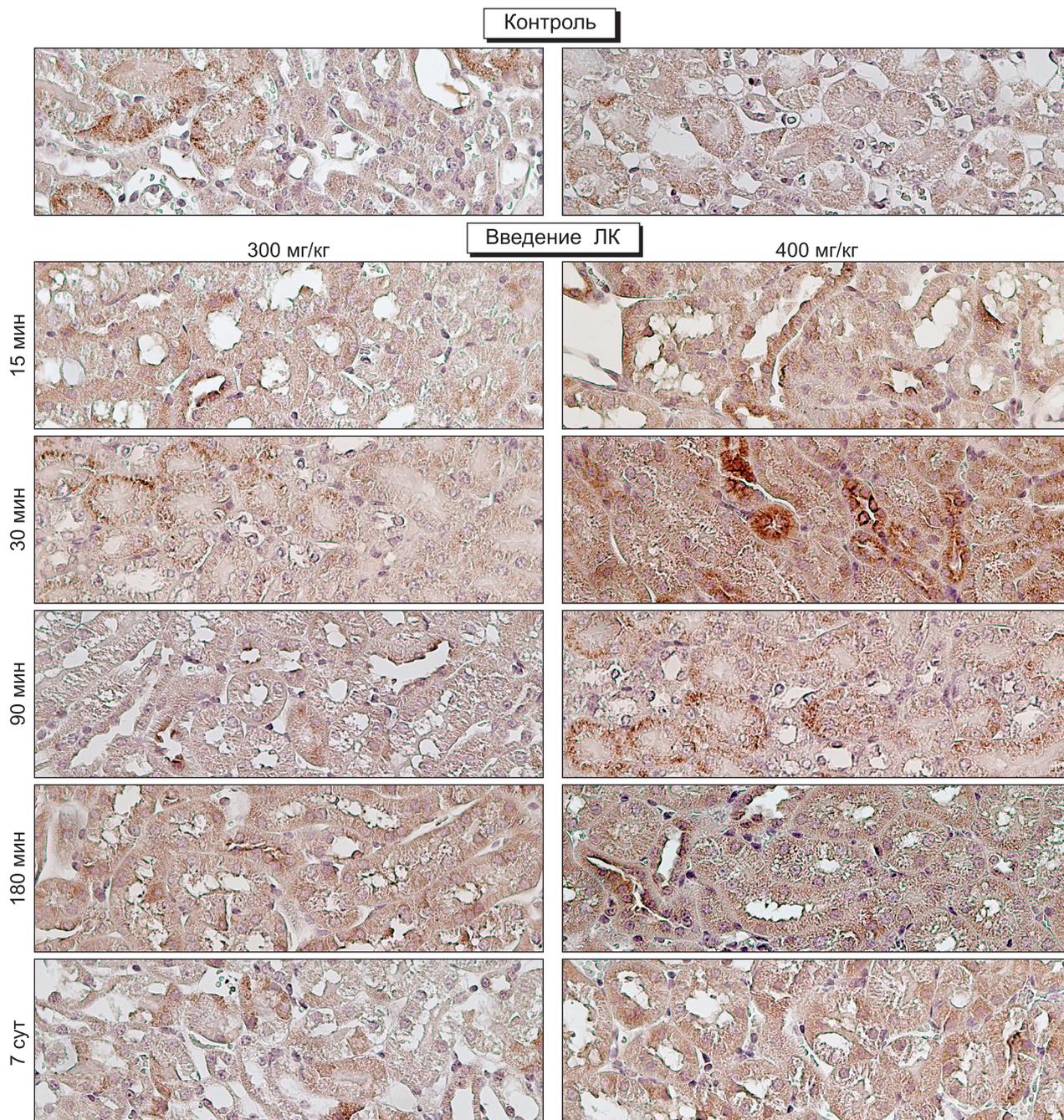


Рис. 3. Иммуногистохимическое окрашивание срезов почки на маркер острого повреждения NGAL через 15, 30, 90, 180 мин и 7 сут после перорального введения ЛК (в дозах 300 и 400 мг/кг), $\times 400$.

стандартное отклонение (*SD*). Достоверность различий между исследуемыми параметрами определяли с использованием *U* критерия Манна—Уитни (непараметрическая статистика) при уровне достоверности 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки острого повреждения почек после введения высоких доз ЛК использовали маркеры Kim1 (Kidney injury molecule 1) и NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin). Kim1 экспрессируется эпителиоцитами канальцев почки при повреждении и является биомаркером нефротоксичности [11,12]. Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов почки в исследуемых группах на маркер Kim1 представлены на рисунке 1. Достоверных различий в уровнях экспрессии данного белка при введении ЛК в дозе 300 мг/кг по сравнению с контролем выявлено не было (рис. 2, *a*), однако отмечалось его повышение в 1.7 раза через 30 мин после введения ЛК в дозе 400 мг/кг (рис. 2, *b*). На более поздних сроках эксперимента уровни экспрессии Kim1 соответствовали показателям в контрольной группе.

Белок NGAL — представитель суперсемейства липокалинов — в настоящее время рассматривается как наиболее ранний маркер острого повреждения почек [12]. Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов почки на маркер NGAL представлены на рисунке 3. Уровень экспрессии данного белка при введении ЛК в дозе 300 мг/кг достоверно не отличался от такового в контроле (рис. 2, *в*), при этом повышался в 3 раза через 30 мин и сохранялся повышенным в 1.4 раза через 90 мин после введения ЛК в дозе 400 мг/кг (рис. 2, *г*). На более поздних сроках эксперимента (180 мин и 7 сут) уровни экспрессии NGAL соответствовали показателям в контрольной группе.

Согласно данным литературы, соли лития относятся к препаратам с узким терапевтическим окном, относительно безопасная доза лития при пероральном приёме для человека составляет от 450 до 1300 мг/сут [13]. Период полувыведения лития — примерно 24 ч, достижение пиковых концентраций у человека происходит в диапазоне 1-3 ч после перорального приёма [7].

Почки являются основным органом выведения лития, данный процесс отличается значительной вариабельностью и зависит от возраста, массы тела и функции почек [13]. Среди наиболее распространённых и хорошо охарактеризованных побочных эффектов терапии литием

считается повреждение почек, приводящее к развитию так называемой литийиндуцированной нефропатии.

Таким образом, несмотря на выявленное повышение экспрессии белков-маркеров острого повреждения почек Kim1 и NGAL у мышей, получавших литий в дозе 400 мг/кг, через 30 и 90 мин, через 7 сут после приёма препарата отмечалось её снижение до значений контрольной группы. Учитывая полученные данные, а также отсутствие сведений о влиянии различных схем приёма препаратов лития (количество доз в сутки) на частоту развития почечной недостаточности [14], можно предположить, что однократное введение ЛК в дозах 300 и 400 мг/кг для проведения литий-нейтронозахватной терапии существенно не повлияет на функцию почек.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № No. 19-72-30005).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Neutron capture therapy: principles and applications* / Eds W.A.G. Sauerwein, A. Wittig, R. Moss, Y. Nakagawa. Berlin; Heidelberg, 2012. doi: 10.1007/978-3-642-31334-9
2. *Jin W.H., Seldon C., Butkus M., Sauerwein W., Giap H.B.* A Review of boron neutron capture therapy: its history and current challenges // *Int. J. Part. Ther.* 2022. Vol. 9, N 1. P. 71-82. doi: 10.14338/IJPT-22-00002.1
3. *Cheng X., Li F., Liang L.* Boron neutron capture therapy: clinical application and research progress // *Curr. Oncol.* 2022. Vol. 29, N 10. P. 7868-7886. doi: 10.3390/currenconcol29100622
4. *Sauerwein W.A.G., Sancey L., Hey-Hawkins E., Kellert M., Panza L., Imperio D., Balcerzyk M., Rizzo G., Scalco E., Herrmann K., Mauri P., De Palma A., Wittig A.* Theranostics in boron neutron capture therapy // *Life (Basel)*. 2021. Vol. 11, N 4. ID 330. doi: 10.3390/life11040330
5. *Barth R.F., Mi P., Yang W.* Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer // *Cancer Commun (Lond)*. 2018. Vol. 38, N 1. P. 35. doi: 10.1186/s40880-018-0299-7
6. *Dymova M.A., Taskaev S.Y., Richter V.A., Kuligina E.V.* Boron neutron capture therapy: current status and future perspectives // *Cancer Commun (Lond)*. 2020. Vol. 40, N 9. P. 406-421. doi: 10.1002/cac2.12089
7. *Malhi G.S., Tanious M., Das P., Berk M.* The science and practice of lithium therapy // *Aust. N. Z. J. Psychiatry*. 2012. Vol. 46, N 3. P. 192-211. doi: 10.1177/0004867412437346
8. *Oruch R., Elderbi M.A., Khattab H.A., Pryme I.F., Lund A.* Lithium: a review of pharmacology, clinical

- uses, and toxicity // *Eur. J. Pharmacol.* 2014. Vol. 740. ID 464-473. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.06.042
9. *Pérez-Castelló I., Mangas-Sanjuan V., González-García I., Gonzalez-Alvarez I., Bermejo M., Marco-Garbayo J.L., Trocóniz I.F.* Population pharmacokinetic model of lithium and drug compliance assessment // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2016. Vol. 26, N 12. P. 1868-1876. doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.11.005
10. *Taskaeva I., Gogaeva I., Shatruk A., Bgatova N.* Lithium enhances autophagy and cell death in skin melanoma: an ultrastructural and immunohistochemical study // *Microsc. Microanal.* 2022. May 20. P. 1-9. doi: 10.1017/S1431927622000745
11. *Ichimura T., Hung C.C., Yang S.A., Stevens J.L., Bonventre J.V.* Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2004. Vol. 286, N 3. P. F552-F563. doi: 10.1152/ajprenal.00285.2002
12. *Zou C., Wang C., Lu L.* Advances in the study of sub-clinical AKI biomarkers // *Front. Physiol.* 2022. Vol. 13. ID 960059. doi: 10.3389/fphys.2022.960059
13. *Couffignal C., Chevillard L., El Balkhi S., Cisternino S., Declèves X.* The Pharmacokinetics of lithium // *The science and practice of lithium therapy / Eds G.S.Malhi, M.Masson, F.Bellivier.* Springer Cham, 2017. P. 25-53. doi: 10.1007/978-3-319-45923-3
14. *Gitlin M.* Lithium side effects and toxicity: prevalence and management strategies // *Int. J. Bipolar Disord.* 2016. Vol. 4, N 1. P. 27. doi: 10.1186/s40345-016-0068-y

Получено 26.06.23

