

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
КЛИНИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛИМФОЛОГИИ –
ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Касатова Анна Исмагиловна

**СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОЧКИ
ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИТИЯ КАРБОНАТА МЫШАМ С
ИМПЛАНТИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ**

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук,
Таскаева Юлия Сергеевна

Новосибирск – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	12
1.1 Современные подходы в терапии злокачественных новообразований. .	12
1.1.1 Физические основы бор-нейтронозахватной терапии.	15
1.1.2 Проблемы и перспективы метода.	16
1.2 Литий.	19
1.2.1 Биологические характеристики солей лития и применение в медицине.	19
1.2.2 Механизмы проникновения лития в клетку и его токсичность.	20
1.2.3 Физические основы использования лития в нейтронозахватной терапии.	22
1.3 Морфология почки.	26
1.4 Острое повреждение почек.	33
1.5 Белки-маркеры острого повреждения почек.	37
1.6 Заключение по литературному обзору.	40
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.	41
2.1 Реагенты.	41
2.2.1 Клеточные культуры.	42
2.2.2 Колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток.	42
2.2.3 Клоногенный анализ.	43
2.2.4 Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой.	44
2.3 Эксперимент <i>in vivo</i>	45
2.3.1 Анализ биораспределения лития.	46
2.3.2 Световая микроскопия	47
2.3.3 ШИК-реакция.	47
2.3.4 Трансмиссионная электронная микроскопия	48
2.3.5 Иммуногистохимия.	48

2.3.6 Морфометрия и статистический анализ.	49
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	51
3.1 Результаты экспериментальных работ <i>in vitro</i>	51
3.1.1 Оценка цитотоксичности препаратов бора на клетках меланомы.	51
3.1.2 Анализ накопления бора в клетках меланомы.	53
3.1.3 Оценка цитотоксичности солей лития на клетках меланомы.	54
3.1.4 Анализ накопления лития в клетках меланомы.	57
3.2 Результаты экспериментальных работ <i>in vivo</i>	58
3.2.1 Изучение биораспределения лития в опухоли, коже, крови, почках, головном мозге.	58
3.2.2 Анализ изменения веса животных после введения лития карбоната для определения острой токсичности.	61
3.2.3 Оценка структурных изменений почки при введении лития карбоната	61
3.2.4 Анализ повреждения почек при введении лития карбоната с учетом данных ШИК-реакции.	68
3.2.5 Ультраструктурная организация фильтрационного барьера и проксимального отдела почки.	69
3.2.6 Оценка экспрессии белков-маркеров острого повреждения почек Kim-1 и NGAL.	84
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.	89
4.1 Сравнительная оценка цитотоксичности и накопления бора и лития <i>in vitro</i>	89
4.2. Биораспределение лития <i>in vivo</i>	93
4.3. Токсичность лития.	97
ВЫВОДЫ.	103
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	107
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.	140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Несмотря на прогресс в развитии диагностики и терапии злокачественных новообразований, заболеваемость онкопатологией и обусловленная ею смертность в большинстве стран мира продолжают расти [49; 85; 103; 132; 273; 292]. В связи с этим представляется высоко актуальной разработка новых методов и технологий, направленных на повышение эффективности терапии злокачественных новообразований и качества и продолжительности жизни пациентов [103; 117; 143; 292].

Меланома кожи является наиболее агрессивным типом рака кожи, возникает из клеток, продуцирующих меланин [100]. За последние несколько десятилетий отмечен неуклонный рост заболеваемости меланомой [30; 275]. Подход к терапии меланомы зависит от размеров опухоли, наличия регионарных/отдаленных метастазов и стадии заболевания. На ранних стадиях применяют хирургическую резекцию опухоли [188]. У пациентов с меланомой на поздних стадиях рассматривается системная терапия, включающая химиотерапию и лучевую терапию [139; 223; 200]. В настоящее время, несмотря на многообещающие достижения в области химиотерапии и таргетной терапии меланомы, представляется актуальным поиск новых подходов к лечению меланомы кожи, а также метастатической меланомы и меланомы внекожной локализации [159; 275].

Одним из наиболее перспективных методов избирательного воздействия на клетки опухоли является бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ). БНЗТ – это форма бинарной лучевой терапии, основанная на высокой способности нерадиоактивного изотопа ^{10}B поглощать тепловой нейтрон, что сопровождается гибелью клеток опухоли, накопивших бор [17; 204]. БНЗТ активно используется для лечения глиобластомы, меланомы, злокачественных новообразований головы и шеи, а также рецидивирующих опухолей молочной железы и отдаленных метастазов [56; 59; 60; 63; 72; 123; 156; 182; 260]. В настоящее время ведутся

клинические испытания в Японии и Китае с участием пациентов с раком головы и шеи и глиобластомой головного мозга [45; 72; 158].

Несмотря на полученные результаты испытаний БНЗТ в клинике, имеется ряд ограничений для ее широкого распространения [25; 86]. Достижение оптимальных концентраций бора в опухолевых клетках и крови является важнейшей проблемой, сдерживающей развитие и эффективное использование БНЗТ при лечении пациентов с различными онкологическими заболеваниями [86; 277]. В настоящее время активно ведутся исследования по разработке препаратов адресной доставки бора для улучшения этих характеристик, однако до сих пор в клинических исследованиях используются препараты бора второго поколения – борфенилаланин и боркаптан [38; 76].

Использование лития вместо бора может представлять собой новый и перспективный вектор развития нейтронозахватной терапии (НЗТ). Литий обладает большим сечением поглощения теплового нейтрона и позволяет обеспечить стопроцентную локальность выделения энергии внутри опухолевой клетки ввиду того, что все продукты данной реакции (α -частица и изотоп водорода тритий) характеризуются высокой линейной передачей энергии [204].

В настоящее время в клинической практике литий активно используется в психиатрии для лечения биполярных расстройств в виде солей (лития карбонат, хлорид и др.) [179; 241]. Более успешное, по сравнению с бором, использование лития, однако, характеризуется относительно узким терапевтическим диапазоном, при этом повышается вероятность развития его токсических эффектов [219]. Одним из наиболее распространенных побочных эффектов при терапии литием является повреждение почек. Тубулопатии при нефрогенном несахарном диабете могут развиваться у 10–40 % пациентов, находящихся на терапии литием, что сопровождается снижением качества их жизни [177; 219]. При этом возможно формирование терминальной стадии хронической почечной недостаточности, развитие которой может наблюдаться у 1,5 % пациентов, получающих терапию литием [177]. Другой литий-ассоциированной патологией является формирование хронической тубулоинтерстициальной нефропатии, а также нефротического

синдрома [176]. Накопленные к настоящему моменту данные о фармакокинетике лития не в полной мере позволяют осуществлять эффективный мониторинг концентраций лития для предотвращения развития побочных эффектов и токсичности [24; 160].

В связи с вышеизложенным, на современном этапе для безопасного применения препаратов лития при проведения литий-нейтронозахватной терапии (ЛиНЗТ) злокачественных новообразований необходимо выявить способность к накоплению лития клетками опухоли *in vitro* и *in vivo* с учетом структурных изменений почки.

Степень разработанности темы диссертации

${}^6\text{Li}$ входит в перечень изотопов, которые обладают большим сечением поглощения теплового нейтрона (более 500 барн), нейтронозахватная реакция с которыми приводит к образованию частиц с высокой линейной передачей энергии [204]. Единичные экспериментальные работы были проведены в период до 1956 года [183; 295], таким образом, систематизированных исследований по изучению возможности использования лития для НЗТ не проводилось. В научной публикации 2010 г. L. M. Rendina призвал рассмотреть возможность использования лития вместо бора для НЗТ, тем не менее данный обзор не привел к повышению интереса к теме [235].

Таким образом, литий соответствует всем физическим характеристикам, необходимым для проведения успешной нейтронозахватной реакции. Однако в настоящее время не известно, введение каких именно доз препаратов лития приведет к достижению концентраций, требуемых для успешной нейтронозахватной реакции. Кроме того, учитывая известную нефротоксичность лития, не ясно, будут ли эти дозы являться токсичными для почек в условиях отдаленного роста опухоли.

Цель исследования

Изучить способность к накоплению лития *in vitro* и *in vivo* и структурную организацию почки на модели меланомы кожи для реализации литий-нейтронозахватной терапии в эксперименте.

Задачи исследования

1. Определить выживаемость и клоногенную активность клеток меланомы кожи человека и мыши *in vitro* при введении бора и лития в концентрациях 40 мкг/мл, требуемых для нейтронозахватной терапии.
2. Провести сравнительную оценку накопления бора и лития опухолевыми клетками меланомы кожи человека и мыши *in vitro* при использовании препаратов бора и лития.
3. Определить концентрации лития в опухоли и почках в динамике у мышей с имплантированной меланомой кожи B16 после введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг и 400 мг/кг.
4. Исследовать структурную организацию почки после введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг и 400 мг/кг у мышей с имплантированной меланомой кожи B16.
5. Изучить ультраструктурные изменения фильтрационного барьера почки и эпителия проксимальных канальцев в динамике после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг и 400 мг/кг у мышей с имплантированной меланомой кожи B16.

Научная новизна

Рассчитаны необходимые концентрации лития в опухоли для успешной реализации литий-нейтронозахватной реакции, описано возможное влияние продуктов реакции на организм.

Впервые выполнено сравнительное исследование накопления препаратов бора и лития в клетках меланомы кожи *in vitro*. Впервые выполнена оценка накопления лития карбоната в опухолевых клетках *in vivo*, впервые рассчитаны

фармакокинетические показатели лития в опухоли (меланомы кожи), и в органах, отдаленных от опухолевого роста – коже, почках и головном мозге. Впервые рассчитаны соотношения концентраций лития (опухоль/нормальная ткань (кожа) и опухоль/кровь). В условиях отдаленного опухолевого роста была впервые выполнена оценка структурной и ультраструктурной организации почки и анализ экспрессии белков-маркеров острого повреждения Kim-1 и NGAL при введении высоких доз лития карбоната (300 и 400 мг/кг).

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования дополняют современные представления об относительной безопасности применения солей лития.

Полученные данные фармакокинетики лития у экспериментальных животных с имплантированной опухолью могут быть использованы для подбора оптимального протокола проведения НЗТ и внедрены в планы дальнейших исследований по нейтронозахватной терапии.

Методология и методы диссертационного исследования

На первом этапе работы была определена цитотоксичность и накопление исследуемых солей лития *in vitro* с использованием клеточных культур меланомы кожи человека и мыши, а также дермальных фибробластов человека. В работе применяли методы культивирования клеток, спектрофотометрический метод, клоногенный анализ. *In vivo* этап исследования включал гистологический, иммуногистохимический методы, трансмиссионную электронную микроскопию, морфометрию. Для определения бора и лития в биологическом материале использовали метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой. Статистические методы исследования применялись для обработки массива полученных данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Литий накапливается в клетках меланомы кожи *in vitro* и *in vivo* в

концентрациях, требуемых для нейтронозахватной терапии, и не оказывает повреждающего воздействия на опухолевые клетки.

2. Однократное введение лития карбоната в дозах 300 и 400 мг/кг животным с имплантированной меланомой кожи B16, приводит к повреждению эпителия проксимальных канальцев на ранних сроках после введения препарата, с последующей регенерацией через 7 суток.

Степень достоверности

Научные положения и выводы обоснованы достаточным объемом проведенных экспериментов *in vitro* и *in vivo*, использованием современных методов исследования, корректным формированием контрольных и опытных групп. Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью актуального пакета современных статистических компьютерных программ.

Апробация работы

Результаты работы представлены и обсуждены на: 4-й Всероссийской школе молодых ученых по бор-нейтронозахватной терапии (Новосибирск, 2022); International Scientific Conference «Innovative Technologies of Nuclear Medicine and Radiation Diagnostics and Therapy» (Москва, 2022); 11-й Young Researchers BNCT Meeting (Virtual congress, 2022); Алмазовском молодежном медицинском форуме–2023, состоявшемся в рамках VI Инновационного Петербургского медицинского форума (Санкт-Петербург, 2023); II International Scientific Conference «Innovative Technologies of Nuclear Medicine and Radiation Diagnostics and Therapy» (Москва, 2023); 5-й Всероссийской школе молодых ученых по бор-нейтронозахватной терапии (Новосибирск, 2023).

Диссертационная работа апробирована на заседании научно-медицинского совета НИИКЭЛ – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск, 2024).

Диссертация выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы НИИКЭЛ – филиала ФГБНУ «Федеральный

исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» по теме «Изучение геномных, молекулярных и клеточных механизмов, разработка новых подходов к прогнозированию, диагностике и коррекции патологии сосудов и соединительной ткани при заболеваниях лимфатической системы, сахарном диабете и злокачественных новообразованиях», номер государственной регистрации 122030100376-1.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора науки, из них 3 статьи в журналах категории К1, входящих в список изданий, распределенных по категориям К1, К2, К3, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus, Web of Science.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, включающих обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, практических рекомендаций, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, содержащего 299 источников, из которых 278 в зарубежных изданиях, и списка иллюстративного материала. Полученные результаты иллюстрированы 5 таблицами и 32 рисунками.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие на всех этапах выполнения работы. Иммуногистохимическое исследование и трансмиссионная электронная микроскопия тканей почки выполнены с участием сотрудников лаборатории

ультраструктурных исследований НИИКЭЛ – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», под руководством д-ра биол. наук, профессора, заведующего лабораторией ультраструктурных исследований НИИКЭЛ – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» Н. П. Бгатовой.

Автор благодарит своего научного руководителя – канд. мед. наук Ю. С. Таскаеву за ценные консультации в организации и проведении экспериментов. Автор также выражает благодарность заведующему сектору 9–21 ИЯФ СО РАН гл. науч. сотр., д-ру физ.-мат. наук С. Ю. Таскаеву и своим коллегам Д. А. Касатову, В. М. Шудло, Я. А. Колесникову, Е. О. Соколовой, А. М. Кошкареву, Т. А. Быкову, С. С. Савинову, М. И. Бикчуриной, П. Д. Пономареву, А. В. Понедельченко, С. П. Сивакову. Автор выражает благодарность научным сотрудникам НИИКЭЛ, д-ру биол. наук, профессору Н. П. Бгатовой, Д. С. Суродину за помощь в организации и проведении исследований и научному сотруднику SPF-вивария ИЦиГ СО РАН д-ру биол. наук И. А. Разумову за помощь в организации исследований in vitro.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные подходы в терапии злокачественных новообразований

По оценке GLOBOCAN (база данных по онкологической заболеваемости Международного агентства исследований рака и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2020 году во всем мире было зарегистрировано 19,3 млн новых случаев злокачественных новообразований [132]. Злокачественные новообразования стали причиной смерти 10 млн человек в 2020 г. (база объединяет данные 185 стран, включая Российскую Федерацию). Авторы также прогнозируют увеличение количества заболевших злокачественными новообразованиями до 28 млн случаев к 2024 году [132; 266].

В 2021 г. в Российской Федерации было впервые выявлено 580 415 случаев злокачественных новообразований. Заболеваемость населения России («грубый» показатель) составила 397,9 случаев на 100 тыс. населения, за 10 лет данный показатель увеличился на 12,1 %, что связано с повышением удельного веса старших возрастных групп среди населения. Стандартизованный показатель заболеваемости злокачественными новообразованиями в Сибирском Федеральном Округе (СФО) в 2021 г. составил 256,15 на 100 тыс. населения, и смертности от них – 216,33 на 100 тыс. населения. Все данные представлены Российским Центром информационных технологий и эпидемиологических исследований в области онкологии [4].

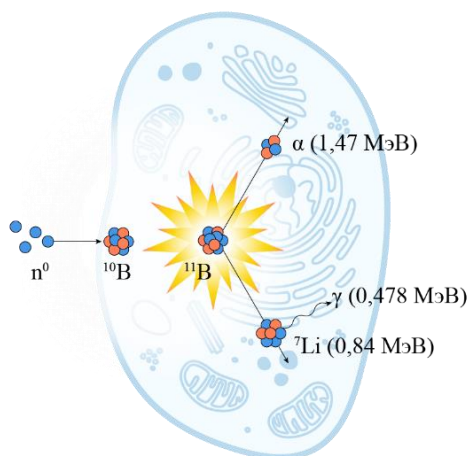
По данным Новосибирскстата – территориального органа Федеральной службы государственной статистики по НСО, второе место по числу смертей занимают новообразования, смертность от которых составила 6,8 тыс. человек, что составило 19 % от всех смертей в регионе (18,4 % в 2018 г.). Вышеизложенные данные говорят о росте заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований как на территории НСО, так и в РФ в целом [10].

Выбор методов лечения пациентов онкологического профиля основывается на локализации злокачественного новообразования, морфологическом диагнозе, молекулярном профиле опухоли, распространенности процесса, состоянии больного и в каждом конкретном клиническом случае происходит соотношение потенциальной пользы и рисков лечения. Хирургическая резекция с последующим морфологическим исследованием материала в большинстве случаев считается «золотым стандартом» лечения пациентов со злокачественными новообразованиями. Противоопухолевая лекарственная терапия объединяет химиотерапию, гормонотерапию, антиангиогенную, таргетную, иммунотерапию и поддерживающую терапию [13]. Стремительное развитие программ скрининга и новых методов лечения онкологических заболеваний улучшает качество жизни и увеличивает ее продолжительность у пациентов со злокачественными новообразованиями. Тем не менее, наличие сложных защитных молекулярных механизмов опухоли, гетерогенность опухолевых клеток, присутствие стволовых раковых клеток и клеток, находящихся на разных стадиях клеточной дифференцировки и клеточного цикла определяют актуальность поиска новых подходов для терапии рака.

Лучевая терапия является важнейшим методом лечения злокачественных новообразований и ряда других заболеваний при помощи ионизирующего излучения за счет повышенной чувствительности клеток опухоли к ионизирующему излучению [8; 88].

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) является активно развивающимся направлением лучевой терапии и в настоящее время уже применяется для лечения ряда злокачественных новообразований, таких как глиобластома, меланома кожи и опухоли головы и шеи [25]. БНЗТ – это бинарный метод радиотерапии злокачественных новообразований, основанный на взаимодействии нерадиоактивного изотопа ^{10}B и теплового нейтрона [265]. Метод БНЗТ использует уникально высокую способность нерадиоактивного ядра ^{10}B поглощать тепловые нейтроны. Поглощение нейтрона бором приводит к мгновенной ядерной реакции $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ (Рисунок 1) [204] с выделением энергии

2,79 МэВ. В 6,1 % случаев энергия распределяется только между ядром лития и α -частицей, в 93,9 % случаев ядро лития вылетает в возбуждённом состоянии и испускает γ -квант с энергией 0,48 МэВ. Продукты ядерной реакции, ядро лития и α -частица, характеризуются высоким темпом торможения и малым пробегом этих частиц в воде или в ткани организма – 5,2 и 7,5 мкм, сравнимым с характерным размером клетки. Темп торможения γ -кванта существенно ниже, средняя длина свободного пробега его в воде составляет 10 см. Следовательно, выделение основной части энергии ядерной реакции $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$, а именно 84 %, ограничивается размером одной клетки. Таким образом, селективное накопление бора-10 внутри клеток опухоли и последующее облучение нейтронами должны приводить к разрушению клеток опухоли с относительно малыми повреждениями окружающих здоровых клеток.



Примечание – в результате взаимодействия нерадиоактивного изотопа ^{10}B и теплового нейтрона происходит ядерная реакция $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ с образованием α -частицы и ядра ^7Li , длина пробега которых составляет 5,2 и 7,5 мкм и образованием 2,79 МэВ энергии; в 93,9 % случаев ядро ^7Li испускает γ -квант с энергией 0,48 МэВ, однако выделение основной энергии бор-нейтронозахватной реакции (84 %) происходит в пределах одной клетки

Рисунок 1 – Схема бор-нейтронозахватной реакции
(Таскаев С. Ю., 2019 [18])

1.1.1 Физические основы бор-нейтронозахватной терапии

В результате взаимодействия ионизирующего излучения с молекулами вещества происходит его ионизация – разрыв химических связей в макромолекулах (прямое воздействие) и образование свободных радикалов (косвенное воздействие) [114]. Считается, что наиболее фатальным для клетки является повреждение ДНК, которое может возникать вследствие одно- и двунитевых разрывов ДНК, межнитевых сшивок, гидролиза, окисления и димеризации азотистого основания [14]. Внутриклеточные ферменты киназы быстро обнаруживают повреждения ДНК и индуцируют активацию многочисленных сигнальных путей, связанных с остановкой клеточного цикла и репарацией ДНК [147]. Если повреждение не может быть полностью восстановлено или произошло неправильное восстановление ДНК, в клетке запускается одна из форм запрограммированной клеточной гибели [157], или некроз, который ассоциируется с побочными эффектами лучевой терапии [125]. Наибольший урон при косвенном воздействии ионизирующего излучения на клетки наносит радиолиз воды. В результате ионизации молекулы воды образуются высокореактивные радикалы водорода H^+ и гидроксила OH^- , которые в свою очередь взаимодействуют с кислородом с образованием гидропероксидных радикалов HO_2 , атомарного кислорода O и пероксидов водорода H_2O_2 , обладающих сильными окислительными свойствами. Несмотря на непродолжительное время существования радикалов, вызванные их взаимодействием цепные реакции, наносят клетке множественные повреждения [6; 35]. Под действием свободных радикалов происходит переокисление липидов – основных компонентов клеточной мембраны. Это приводит к нарушению ее проницаемости и клеточной гибели [129]. При воздействии свободных радикалов на белки нарушается их вторичная и третичная структура, а, следовательно, происходит утрата их функции [142]. Воздействие ионизирующего излучения с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ) на клетку может приводить к формированию сложных кластерных повреждений

ДНК, определяемых как два или более повреждения ДНК, индуцированных в непосредственной близости [96; 238]. Механизм, определяющий, какой путь репарации будет выбран, может зависеть от клеточного цикла или индуцирующего фактора [211; 255]. Чем выше ЛПЭ, тем выше относительная биологическая эффективность (ОБЭ) [26; 93].

1.1.2 Проблемы и перспективы метода

Для успешной реализации БНЗТ необходимы: а) источник нейтронов; б) препарат доставки бора; в) дозиметрия.

Опыт использования реакторов для получения эпитепловых нейтронов выявил сложность воссоздания пучка с параметрами, необходимыми для клинического применения. Нейтроны в узком диапазоне энергий (вблизи верхней границы в эпитепловом диапазоне: от 0,5 эВ до 30 кэВ) с высокой плотностью потока $10^9 \text{ см}^{-2} \text{ с}^{-1}$ необходимы для проведения БНЗТ.

Учитывая эти требования, было разработано несколько источников нейтронов на основе ускорителей заряженных частиц: Southern Tohoku BNCT Research Center (Фукусима, Япония); National Cancer Center Hospital (Токио, Япония); Kansai BNCT Medical Center, Osaka Medical College (Осака, Япония); Ibaraki Neutron Medical Reserch Center, University of Tsukuba, (Цукуба, Япония); Helsinki University Hospital (Хельсинки, Финляндия); Xiamen Humanity Hospital (Ксиамен, Китай), ускоритель-тандем с вакуумной изоляцией и литиевой нейтронгенирующей мишенью (Vacuum-Insulated Tandem Accelerator (VITA)) в ИЯФ СО РАН (Новосибирск, Россия) и некоторые другие.

Кроме того, для успешного проведения бор-нейтронозахватной терапии требуется препарат, содержащий изотоп ^{10}B , который будет селективно накапливаться в необходимых эффективных концентрациях в опухоли. Были разработаны требования к агентам доставки бора, согласно этим требованиям, «идеальный» кандидат должен обладать следующими характеристиками [38; 243]: а) концентрация ^{10}B в ткани опухоли должна составлять 20 мкг/г и более и

сохраняться в опухолевой ткани в течение всего периода облучения; б) соотношение содержания ^{10}B в опухоли/здоровой окружающей ткани и опухоли/крови должно составлять 3/1 и более; в) борсодержащий агент должен быть нетоксичным.

К первому поколению агентов доставки бора относятся борная кислота и ее соли, которые показали свою низкую эффективность и селективность накопления опухолью, вследствие чего от них решено было отказаться [167; 201].

Несмотря на многочисленные исследования в области поиска нового наиболее подходящего для БНЗТ агента доставки бора, наиболее используемыми для проведения клинических испытаний и коммерчески доступными зарегистрированными препаратами являются препараты второго поколения – борфенилаланин и боркапнат. Однако эти агенты не являются идеальными кандидатами доставки ^{10}B по ряду причин – они не обладают высокой избирательностью накопления в ткани опухоли, а механизм их накопления недостаточно изучен [37; 259].

Боркапнат натрия является производным анионного карборана и применяется в виде натриевой соли, он содержит в своем составе 12 атомов бора. Его накопление в опухоли происходит посредством пассивной диффузии через опухоль-ассоциированные капилляры. Существует предположение, что транспортировка боркапната натрия из крови в клетки злокачественных новообразований головного мозга осуществляется за счёт нарушения целостности гематоэнцефалического барьера, вызванного прогрессией опухолевого очага [67]. Особенностью его накопления является то, что содержание бора в опухоли и в крови приблизительно сопоставимо [266], однако соотношение концентрации в опухолевой и окружающей здоровой тканях составляет 3/1 и является подходящим для проведения БНЗТ. Одним из недостатков данного соединения является значительное непостоянство накопления ^{10}B опухолью [68; 69; 112]. Тем не менее, боркапнат натрия активно применяют в клинических исследованиях как в Японии [90], так и в Европе [224].

Борфенилаланин является структурным производным аминокислоты L-фенилаланина, содержит только один атом ^{10}B в своей структуре [258]. Накопление борфенилаланина происходит посредством аминокислотного транспорта LAT-1 и LAT-2 типов и обусловлено более интенсивной пролиферацией и белковым синтезом, происходящим в опухолевых клетках. Впервые его начали применять для лечения пациентов с меланомой [192; 283], основываясь на идее повышенного захвата предшественников меланина клетками меланомы [247]. Однако дальнейшее изучение свойств этого препарата показало его накопление, в том числе, и в безпигментных опухолях, что позволило применять его для БНЗТ опухолей различной локализации [55; 66; 62; 91; 123; 246]. Вариабельность поглощения борфенилаланина также была показана с использованием различных опухолевых клеточных линий *in vitro* [122]. Данный борсодержащий препарат продолжает использоваться в клинических испытаниях в США [105], Японии [61], Финляндии [64; 170], Швеции [80] и некоторых других странах [91].

Несмотря на значимые результаты клинических исследований БНЗТ, остро стоит проблема создания новых агентов доставки бора, которые могли бы соответствовать всем требованиям идеального препарата для БНЗТ. В настоящий момент идет активная разработка новых агентов доставки бора третьего поколения: биомолекулы с низкой молекулярной массой, такие как порфирины, нуклеиновые и аминокислоты, углеводы и биомолекулы с высокой молекулярной массой – моноклональные антитела, полилизин, эпидермальные и сосудистые эндотелиальные факторы роста, липосомы и наночастицы рассматриваются в качестве адресных систем доставки бора [11; 31; 38; 53; 57; 199; 217; 228; 262; 274; 286; 280].

Следует отметить, что во всех клинических испытаниях начиная с 1968 г. и по настоящее время использовались агенты доставки бора второго поколения борфенилаланин и боркаптат, которые до сих пор остаются единственными сертифицированными и коммерчески доступными препаратами [76]. В настоящее время одной из основных проблем успешного проведения БНЗТ является

достижение необходимых показателей концентрации бора в крови и клетках опухоли в определенный период времени, при этом ни один из существующих агентов доставки, используемых в клинических испытаниях БНЗТ, в полной мере не соответствует этим требованиям [99]. Учитывая обозначенные проблемы с селективной доставкой бора в опухолевые клетки, радикально иным подходом к проведению нейтронозахватной терапии (НЗТ) может стать переход на новую реакцию с использованием атомов других элементов, в частности, с применением лития вместо бора.

1.2 Литий

1.2.1 Биологические характеристики солей лития и применение в медицине

Соли лития начали активно применять во второй половине XIX века, когда английский врач Garrod A. впервые оценил их эффект при лечении пациентов с подагрой, а также рекомендовал их при мании и депрессии [193]. В 1949 году австралийский психиатр J. F. Cade обнаружил, что соли лития (лития карбонат и цитрат) оказывают успокаивающий эффект на пациентов с манией, не вызывая снотворного действия [81; 194]. В независимом исследовании, проведенном Corcoran A. C. и коллегами, [97] были отмечены симптомы интоксикации после употребления лития хлорида в качестве заменителя соли (натрия хлорид) у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, которые привели к нескольким летальным исходам, что приостановило использование солей лития в психиатрической практике.

С 1961 г. различные соединения лития были зарегистрированы в странах Европы, кроме того начали появляться приборы, позволяющие определять уровень лития в плазме крови пациентов, что значительно упростило использование лития в клинической медицине [254]. Наконец в 1970 г. препараты лития были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством

продуктов и медикаментов США (US Food and Drug Administration) для лечения мании [254], что послужило началом нового этапа изучения фармакологии лития и его применения в медицинской практике.

Литий эффективен при лечении биполярного расстройства, в частности, для купирования маниакального состояния, а также в качестве дополнительной фармакотерапии при рефрактерной депрессии [48; 83], а также доказал свою эффективность в снижении риска суицида [36]. Несмотря на появление новых, современных нормотимических препаратов, литий остается крайне востребованным и широко используемым соединением в психиатрической практике [28; 128; 191; 225].

1.2.2 Механизмы проникновения лития в клетку и его токсичность

Механизмы поступления лития в клетки полностью не изучены, однако известно несколько типов транспорта ионов лития в клетку: а) Na^+ зависимый транспорт в клетку и из нее через плазматическую мембрану; б) Na^+/K^+ насос, обеспечивающий только поступление лития в клетку; в) пассивный транспорт через потенциал-зависимые натриевые каналы, обусловленный одинаковой проницаемостью как для ионов Na^+ , так и для ионов Li^+ [116; 179; 229; 289]. Внутриклеточная концентрация лития значительно ниже, чем его концентрация в крови или внеклеточной жидкости. Таким образом, можно предположить, что механизм действия лития частично опосредован взаимодействием с внешней поверхностью мембраны клетки. Выход лития из клетки во внеклеточное пространство происходит в основном за счет электронейтрального $\text{Na}^+ - \text{Li}^+$ – насоса [289]. Ион лития Li^+ имеет ионный радиус, аналогичный ионному радиусу иона магния, Mg^{2+} , что обуславливает его способность конкурировать с магнием – в терапевтических концентрациях литий может ингибировать семейство ферментов фосфодиэстеразы, тирозин киназу и специфические изоформы аденилат циклазы, гликогенсинтазу киназу-3 бета (GSK-3 β) и некоторые другие ферменты, обеспечивая терапевтический эффект лития [136; 154; 172; 293].

Литий обладает узким терапевтическим индексом, что увеличивает риск передозировки. Литий в настоящее время в России коммерчески доступен в таблетированной лекарственной форме с действующим веществом лития карбонат, который назначают перорально по 0,4–2,0 г/день, максимальная суточная доза для взрослых составляет 2,4 г [94; 179; 213]. Дозировка препарата зависит от одновременного применения других лекарственных препаратов и от наличия сопутствующих заболеваний, в частности, функции почек.

Мониторинг концентрации лития в плазме крови осуществляется один раз в неделю, если концентрация ионов лития превышает 1,2 ммоль/л, требуется корректировка дозы литийсодержащего препарата [22; 28; 176; 252; 291]. Даже регулярное и правильное употребление препарата может привести к таким серьезным последствиям, как манифестация несахарного диабета, гипотиреоза и почечной недостаточности [169; 226]. Однако в проводимых исследованиях отмечают дозозависимость проявлений побочных эффектов терапии литием [109; 185].

Литий не метаболизируется и выводится почками, около 80 % лития фильтруется в клубочках и реабсорбируется – 60 % в проксимальных канальцах и 20 % в толстой восходящей части петли Генле и собирательных трубочках [126]. Проявления нефротоксичных эффектов лития, связанных с постоянным приемом препарата, включают в себя ранние тубулоинтерстициальные повреждения, которые, как правило, носят функциональный характер и являются обратимыми, и необратимые морфологические тубулоинтерстициальные изменения [175]. Клинически такие повреждения могут проявляться в виде полиурии, нефрогенного несахарного диабета, снижение скорости клубочковой фильтрации и хронической почечной недостаточности (ХПН) [144; 232; 281].

1.2.3 Физические основы использования лития в нейтронозахватной терапии

Новым подходом к успешному проведению нейтронозахватной терапии (НЗТ) может стать применение ядер других элементов, которые, как и бор, обладают большим (более 500 барн) сечением поглощения теплового нейтрона [214]. В таблице 1 представлены изотопы, вероятность взаимодействия с тепловым нейтроном которых высока, и они могут рассматриваться в качестве альтернативны бору-10 [16; 18]. У большей части из них – ^{113}Cd , ^{135}Xe , ^{149}Sm , ^{151}Eu , ^{155}Gd , ^{157}Gd , ^{174}Hf , ^{199}Hg – продуктом реакции с нейтроном (n,γ) является γ -излучение, характеризующееся низким темпом торможения (длина свободного пробега в биологической ткани составляет около 10 см) и низкой линейной передачей энергии, что не обеспечивает локальности выделения большого количества энергии, как в случае реакции с бором $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$.

^{157}Gd имеет большое сечение поглощения теплового нейтрона (254000 б), в результате (n,γ)-реакции происходит выделение 7,94 МэВ, что позволило использовать его для НЗТ [21; 155]. В ходе реакции, происходит выделение ожэ-электронов и электронов конверсии с энергией 63 кэВ, однако, основным продуктом реакции является γ -излучение, поэтому не смотря на успешность испытаний, физические основы не позволяют говорить о локальности выделения энергии в результате реакции взаимодействия ^{157}Gd и теплового нейтрона [17].

Реакции, в результате которых образуются частицы с высокой линейной передачей энергии (α -частицы и продукты деления ядер) обеспечивают локальное повреждение клеток, в которых присутствует изотоп, с минимальным эффектом на окружающие клетки, в которых этот изотоп отсутствует. Применение ядер этих элементов относительно малоизучено вследствие предполагаемой высокой токсичности или радиоактивности, а основные экспериментальные и клинические исследования по НЗТ были проведены с использованием ^{10}B или ^{157}Gd . Многолетний мировой опыт применения лития в медицине позволяет нам

предложить использовать литий в качестве альтернативы бору для НЗТ (Таблица 1).

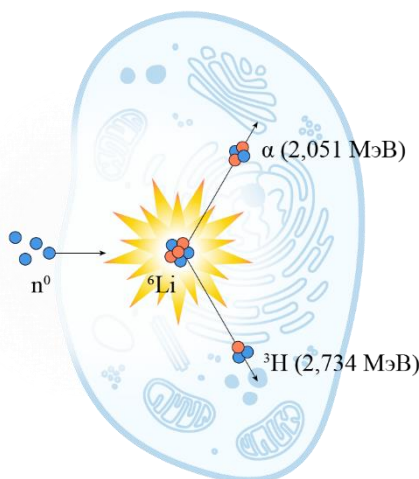
Таблица 1 – Изотопы с большим сечением захвата теплового нейтрона

Изотоп	Распространённость, %	Период полураспада	Вид реакции	Сечение, б
^3He	0,000013	—	(n,p)	5333
^6Li	7,4	—	(n, α)	940
^{10}B	20	—	(n, α)	3 835
^{113}Cd	12	—	(n, γ)	20 600
^{135}Xe	—	9,14 ч	(n, γ)	2 720 000
^{149}Sm	14	—	(n, γ)	42 080
^{151}Eu	48	—	(n, γ)	9 200
^{155}Gd	15	—	(n, γ)	61 100
^{157}Gd	15	—	(n, γ)	259 000
^{174}Hf	0,16	$2 \cdot 10^{15}$ лет	(n, γ)	561
^{199}Hg	17	—	(n, γ)	2 150
^{235}U	—	$7 \cdot 10^8$ лет	(n,f)	681
^{241}Pu	—	13,2 года	(n,f)	1 380
^{242}Am	—	16 ч	(n,f)	8 000

Литий-нейтронозахватная терапия может стать более перспективной методикой нейтрон-захватной терапии, поскольку приносит новое качество – 100 % выделение энергии ядерной реакции в клетках опухоли, вместо 84 % в БНЗТ.

В реакции $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ испускаются α -частица и атомное ядро лития-7. В 94 % случаев литий испускается в возбужденном состоянии и возбуждение снимается излучением 478 кэВ фотона. Энергетический баланс этой реакции такой, что в среднем из 2,79 МэВ энергии ядерной реакции 2,34 МэВ выделяется в клетках опухоли и 0,45 МэВ выделяется в окружающей ткани. В реакции $^6\text{Li}(n,\alpha)^3\text{H}$ излучаются только частицы с высоким темпом торможения – атомное

ядро трития энергией 2,734 МэВ, которое в ткани организма тормозится на длине 26 мкм, и α -частица энергией 2,051 МэВ, которая тормозится на длине 11 мкм. В реакции ${}^6\text{Li}(n,\alpha){}^3\text{H}$ все 100 % энергии выделяется в клетках опухоли, содержащих литий (Рисунок 2).



Примечание – в результате взаимодействия нерадиоактивного изотопа ${}^6\text{Li}$ и теплового нейтрона происходит ядерная реакция ${}^6\text{Li}(n,\alpha){}^3\text{H}$ с образованием α -частицы и изотопа водорода (${}^3\text{H}$), длина пробега которых составляет 11 и 26 мкм и образованием 4,79 МэВ энергии без образования сопутствующего γ -излучения

Рисунок 2 – Схема литий-нейтронозахватной реакции

Один из продуктов реакции, тритий, является радиоактивным. Тритий имеет период полураспада 12,32 года. При распаде трития выделяется 18,6 кэВ энергии, из них 5,7 кэВ в виде кинетической энергии электрона, а оставшаяся энергия уносится почти не обнаруживаемым электронным антинейтрино. Поскольку энергия электрона почти на три порядка по величине меньше энергии реакции ${}^6\text{Li}(n,\alpha){}^3\text{H}$, то накопление трития не должно представлять радиационной опасности.

Хотя данные факты хорошо известны, исследований по ЛиНЗТ не проводили. Помимо статьи 1936 г., в которой описана идея нейтрон-захватной терапии [180], на возможность использования лития указывалось еще в

нескольких работах [183; 235; 295]. Возможно, развитие ЛиНЗТ сдерживало предположение о высокой токсичности лития, а также сложности получения изотопа лития, используемого в ядерной промышленности.

Известно, что для успешного проведения БНЗТ необходимо, чтобы концентрация ^{10}B в опухоли составляла 20 мкг/г и более [38]. Согласно теоретическим расчетам, сечение реакции $^6\text{Li}(n,\alpha)^3\text{H}$ в 4 раза меньше, чем сечение реакции $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$, а энерговыделение в 2 раза больше, таким образом, концентрация ^6Li в опухоли, необходимая для литий-нейтронозахватной реакции должна составлять ≥ 40 мкг/г. При концентрации ^6Li в опухолевых клетках 40 мкг/г вклад дозы ядерной реакции поглощения нейтронов литием составит 55 % от общей физической дозы, что достаточно для терапии с избирательным накоплением лития в опухолевых клетках [40].

Уникальной особенностью литий-нейтронозахватной терапии (ЛиНЗТ) является локальное 100 % выделение энергии от ядерной реакции $^6\text{Li}(n,\alpha)^3\text{H}$ внутри клетки, в отличие от БНЗТ, где 16 % уносит с собой γ -излучение, имеющее низкий темп торможения в тканях. Это свойство потенциально делает ЛиНЗТ методикой действительно избирательного уничтожения клеток злокачественных опухолей.

1.3 Морфология почки

Почка – это парный мочеобразующий орган, который наряду с выделительной функцией регулирует водно-электролитный обмен, кислотно-основное равновесие, артериальное давление, а также выполняет эндокринную функцию [2].

Почку окружает тонкая соединительнотканная капсула, которая состоит из фасции, жировой и фиброзной капсул, непосредственно прилегающих к почке. Паренхиму почки составляет корковое и мозговое вещество, а также внутрипочечные мочесобирательные пути – чашечки и лоханка. В корковом веществе находятся почечные тельца, состоящие из капиллярного клубочка и

капсулы Боумэна–Шумлянского, извитые канальцы нефронов и мозговые лучи, которые с окружающим их корковым веществом образует почечную дольку. Мозговое вещество находится под корковым веществом и образовано прямыми канальцами юкстамедуллярных нефронов и собирательными трубками, оно проникает в корковое вещество мозговыми лучами [7; 12].

Нефрон является структурно-функциональной единицей почки, и состоит из почечного тельца (начальная часть нефрона) и канальцевой части, разделенной на пять отделов. Корковые нефроны характеризуются петлей Генле, которая либо вся лежит в корковом веществе, либо доходит до наружной зоны мозгового вещества пирамид, а юкстамедуллярные – петлей Генле большей длины, чем в корковых нефронах, расположенной в пирамидах мозгового вещества [20].

В начальной части нефронов происходит фильтрация первичной мочи из крови в полость капсулы почечного тельца. В канальцевой части нефрона происходит реабсорбция воды и ряда веществ из первичной мочи в кровь, а также секреция веществ, после чего образуется вторичная моча, которая по собирательным трубкам выводится в почечные чашечки и лоханку [168]. Канальцевая часть нефрона отходит от капсулы Боумэна–Шумлянского и состоит из пяти переходящих друг в друга канальцев: а) проксимальный извитой; б) проксимальный прямой; в) тонкий; г) дистальный прямой и д) дистальный извитой канальцы (Рисунок 3).

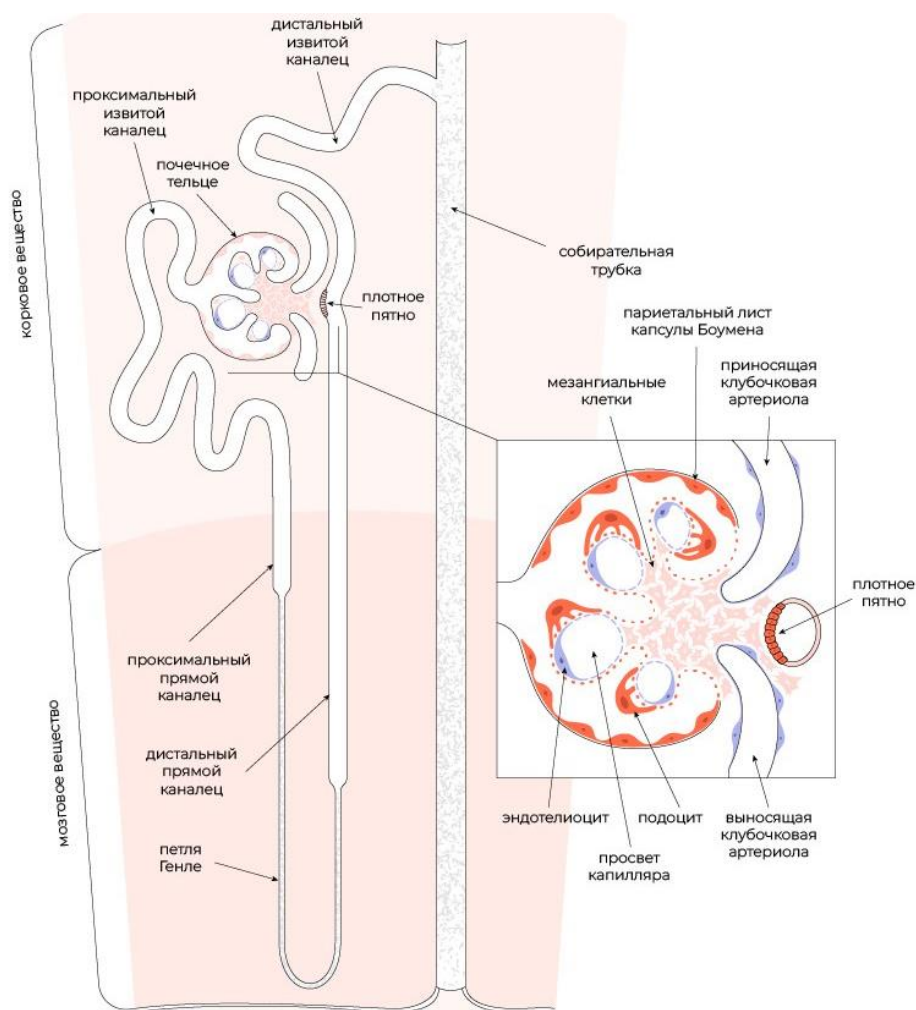


Рисунок 3 – Схема строения нефрона (Zhuo J. L., 2013 [298])

Почечное тельце осуществляет функциональную связь между системой кровообращения и мочевыделительной системой, оно состоит из капсулы Боумэна–Шумлянского и капиллярного клубочка. В клубочке происходит фильтрация содержимого плазмы крови из капилляров в просвет капсулы. Капсула Боумэна–Шумлянского имеет париетальный листок, состоящий из париетальных эпителиальных клеток и висцеральный листок, который состоит из висцеральных эпителиальных клеток – подоцитов.

Стенка кровеносного капилляра клубочка (клубочковый фильтрационный барьер) состоит из 4 компонентов: (1) фенестрированные эндотелиоциты, (2) мезангиальные клетки, (3) трехслойная клубочковая базальная мембрана и (4) висцеральные эпителиальные клетки (подоциты) (Рисунок 4).

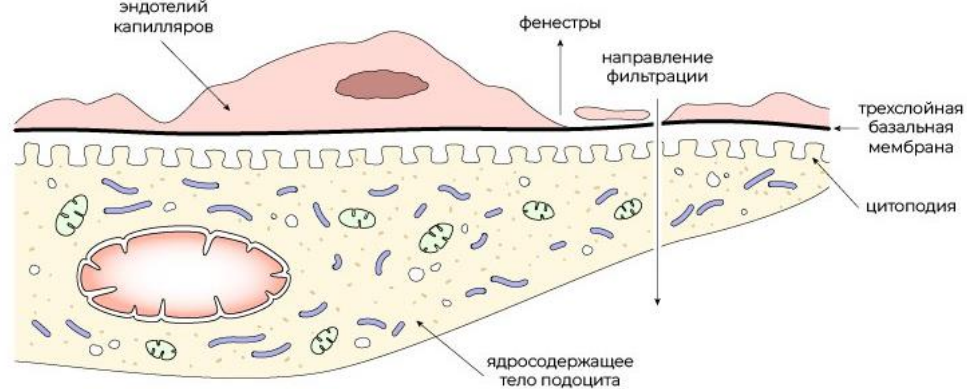


Рисунок 4 – Схема строения фильтрационного барьера почки
(Daehn I. S., 2021 [101])

Эндотелиальные клетки клубочков – высокодифференцированные клетки, выстилающие капилляры клубочков и образующие первый слой клубочкового фильтрационного барьера. Эндотелиальные клетки фенестрированы и покрыты гликокаликсом [87]. Фенестры обеспечивают беспрепятственный проход воды и небольших молекул растворенных веществ из просвета капилляров клубочка через эндотелиальные клетки без необходимости эндоцитоза или рецептор-опосредованных механизмов. Фенестры покрывают около 50 % площади поверхности капилляров клубочков. Они имеют форму песочных часов, наименьший диаметр фенестрации находится посередине между апикальной и базальной поверхностями [284].

Поскольку фенестры вносят основной вклад в гидравлическую проницаемость фильтрационного барьера, они влияют на скорость клубочковой фильтрации. Их потеря связана со снижением фильтрационной функции почек при различных заболеваниях.

Гликокаликс обогащен отрицательно заряженными протеогликанами, которые образуют сеть с гликозаминогликанами. Гликокаликс способствует регуляции сосудистой проницаемости и жидкостного баланса. Толщина гликокаликса превышает размеры молекул клеточной адгезии, которые

экспрессируются эндотелиальными клетками, что препятствует адгезии клеток крови к эндотелию капилляра. Слой эндотелиального гликокаликса выстилает открытые фенестры и покрывает поверхность подоцитов [279]. Фенестры эндотелиальных клеток клубочков являются критическим компонентом барьера клубочковой фильтрации. Их уникальная структура является ключевой для их функции в обеспечении гидравлической проницаемости клубочков, а их нарушение при заболевании может способствовать потере функции клубочковой фильтрации [276].

Мезангиальные (межсосудистые) клетки представляют собой стромальные клетки, поддерживающие клубочковую структуру и регулирующие клубочковую фильтрацию, и участвующие в иммуновоспалительных процессах [267]. Мезангиальные клетки составляют примерно 30–40 % от общего числа клеток клубочка. Морфологически мезангиальные клетки имеют низкое ядерно/цитоплазматическое соотношение и содержат фибриллы в цитоплазме [196]. Вместе с мезангиальным матриксом, мезангиальные клетки образуют базальную мембрану клубочка. Кроме того, мезангиальные клетки секретируют несколько видов воспалительных цитокинов, молекул адгезии, хемокинов и ферментов, участвующих в процессе фиброза почечных клубочков [297].

Области, где не происходит прямого контакта мезангиальных клеток и стенок эндотелия, называются экстрагломерулярным мезангием. Компоненты внеклеточного матрикса содержат объемные микроволокна, прикрепленные к мембране фибронектином, что приводит к образованию твердой структуры. Мезангиальные клетки окружены секретлируемым внеклеточным матриксом, который состоит в основном из коллагена IV, ламинина, фибронектина и протеогликанов. Мезангиальные клетки могут реагировать на повреждение, приобретая миофибробластический фенотип, что приводит к изменению мезангиального матрикса [39]. Мезангиальные клетки могут оказывать механическое воздействие на гломерулярную базальную мембрану и эндотелий сосудов через эти волокнистые структуры и контролировать капиллярное давление и, соответственно, скорость ультрафильтрации плазмы в клубочках.

Такое соединение также обеспечивает соответствующую структурную основу для фильтрации крови. Мезангиальные клетки демонстрируют структурные и функциональные характеристики гладких мышц и фибробластов; таким образом, могут быть определены как миофибробласты [87]. Мезангиальные клетки регулируют баланс продукции и деградации мезангиального матрикса и передачу сигналов другим клеткам для поддержания нормального гомеостаза клубочков [187; 206].

Подциты – это высокоспециализированные эпителиальные клетки почечного клубочка, которые окружают капилляры и соседствуют с клетками капсулы Боумэна–Шумлянского. Тело подцита содержит ядро, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум и митохондрии [230]. От тела отходят крупные отростки – цитотрабекулы, которые непосредственно или после дополнительного ветвления заканчиваются цитоподиями [148; 272]. Между цитоподиями находится щелевая диафрагма, которая играет важную роль в установлении избирательной проницаемости клубочкового фильтрационного барьера, предотвращении попадания белков плазмы в ультрафильтрат мочи. Тела клеток и цитотрабекулы обычно не прикреплены напрямую к базальной гломерулярной мембране, а находятся в фильтрате в капсуле Боумэна–Шумлянского [215].

Динамика цитоскелета и структурная пластичность подоцитов, а также передача сигналов между каждым из этих отдельных слоев важны для эффективной клубочковой фильтрации и, следовательно, для нормальной функции почек. Цитотрабекулы связаны микротрубочками и промежуточными филаментами, в то время как цитоподии содержат цитоскелет на основе актина [148]. Между цитоподиями подоцитов находится щелевая диафрагма, которая регулирует реорганизацию актина подоцитов и структуру базальной гломерулярной мембраны и играет важную роль в установлении избирательной проницаемости барьера клубочковой фильтрации [210]. Цитоподии имеют, отрицательно заряженную оболочку (гликокаликс), обращенную к ультрафильтрату мочи; это объясняет отрицательные поверхностные заряды по всей поверхности фильтрационного барьера, что способствует

электростатическому отталкиванию между соседними цитоподиями и помогает поддерживать уникальную цитоархитектуру подоцитов. Основным структурным компонентом цитоподий подоцитов является актиновая цитоскелетная сеть, которая представлена плотным пучком актиновых филаментов и актин-ассоциированных белков, таких как α -актинин 4, синаптоподин и миозин [118; 166].

Гломерулярная базальная мембрана представляет собой специализированный внеклеточный матрикс, который поддерживает прикрепленные к нему эндотелиальные клетки и подоциты, и отделяет сосудистую сеть от мочевого пространства. Гломерулярная базальная мембрана образуется в результате слияния двух отдельных базальных мембран, одна из которых синтезируется подоцитами, а другая – гломерулярными эндотелиальными клетками. Более плотный средний слой представлен каркасом фибрилл из синтезированного коллагена IV типа. Как и все базальные мембраны, гломерулярная базальная мембрана представляет собой волокнистую сеть, состоящую из ламинина, коллагена IV типа, нидогенов и протеогликанов [7; 39].

Стенку проксимальных канальцев образует однослойный кубический эпителий, в клетках которого имеется множество пиноцитозных пузырьков и митохондрий, концентрирующиеся, в основном, в базальной части клеток. На апикальной поверхности клеток имеется щеточная каемка, образованная микроворсинками [7].

На уровне световой микроскопии каждый проксимальный каналец состоит из трех соединяющихся сегментов: а) сегмента S1, который включает начальную и среднюю часть проксимального извитого канальца; б) сегмента S2, включающего в себя позднюю часть проксимального извитого канальца и начальную часть проксимального прямого канальца; в) сегмент S3, который представляет собой оставшуюся часть проксимального прямого канальца [298].

В проксимальных канальцах происходит активная реабсорбция большей части оказавшихся в фильтрате веществ. Этой высокой функциональной

активности соответствуют отмеченные особенности строения: щеточная каемка и базальная складчатость, которые увеличивают поверхность для реабсорбции.

Юкстагломерулярный аппарат представляет собой совокупность высокоспециализированных клеток, функцией которого является поддержание постоянства градиента давления между приносящей и выносящей клубочковыми артериолами для обеспечения образования первичной мочи. Он состоит из юкстагломерулярных и юкставаскулярных клеток, а также из клеток плотного пятна. Юкстагломерулярные клетки располагаются в стенке приносящей артериолы, контактируют с плазмой крови через фенестры эндотелиоцитов, с ультрафильтратом мочи через щели в плотном пятне. Клетки секретируют ренин, под действием которого образуется ангиотензин, влияющий на артериальное давление, этот фермент увеличивает фильтрацию и образование первичной мочи, кроме того он влияет на реабсорбцию воды и натрия [251]. Юкставаскулярные клетки располагаются между приносящей и выносящей клубочковыми артериолами и плотным пятном, с которым контактируют за счет отростков. Эти клетки также секретируют ренин, когда истощается резерв юкстагломерулярных клеток. Плотное пятно расположено между приносящей и выносящей артериолами, его клетки имеют рецепторы к ионам натрия, которые позволяют определить изменение содержания натрия в моче и воздействовать на юкстагломерулярные клетки [12; 212].

Кровоснабжение в почке осуществляется через почечную артерию, которая распадается на междольевые артерии, идущие между пирамидами вглубь паренхимы почки, на границе коркового и мозгового вещества они разветвляются на дуговые артерии, от которых в корковое вещество отходят междольковые артерии, которые разветвляются на приносящие артериолы, каждая из которых идет к почечному тельцу, где распадаются на капиллярный клубочек. Капиллярный клубочек покидает выносящая артериола, которая распадается на перитубулярную сеть капилляров коркового вещества, из них кровь собирается в притоки дуговых вен, затем в междольевые вены и в почечную вену. В почке имеется две капиллярных сети: а) клубочковая, функция которой – фильтрация

крови и образование первичной мочи; б) – перитубулярная, в которую происходит реабсорбция электролитов и воды.

1.4 Острое повреждение почек

Острое повреждение почек (ОПП) – это клинический термин, используемый для обозначения снижения или потери функции почек [130; 138; 288; 234]. Согласно данным литературы, данный термин был введен на смену термину «острая почечная недостаточность» для стандартизации последующих эпидемических исследований [240; 245]. Отмечается рост ОПП вследствие повышения удельного веса старших возрастных групп среди населения и увеличения спроса на лекарства с различной степенью нефротоксичности, развитие ОПП характеризуется высоким уровнем смертности [124].

В зависимости от повреждения морфологических структур почки можно выделить следующие виды патологии: а) гломерулопатия – поражаются клубочки; б) тубулопатия – поражается эпителий канальцев; в) нефроз – поражаются почечные канальца, г) пиелонефрит – воспаление, связанное с нарушениями уродинамики [15].

Как экспериментальные, так и клинические исследования показали ключевую роль повреждения подоцитов в развитии и прогрессировании гломерулопатии. Гломерулопатия характеризуется различными структурными изменениями в подоцитах – гипертрофией, сглаживанием цитоподий, образованием псевдокист, накоплением лизосомальных ферментов в цитоплазме и отслоением от гломерулярной базальной мембраны, пролиферацией мезангиальных клеток и выработкой ими большого количества мезангиального матрикса, сдавлением капилляров клубочка и увеличением его размеров, что приводит к снижению фильтрационной функции почки, характеризуется появлением отеков, протеинурией и гематурией и артериальной гипертензией.

При гломерулопатиях с протеинурией сглаживание цитоподий может быть необратимым, приводящим к прогрессирующей протеинурии и развитию

терминальной стадии почечной недостаточности, или обратимым с восстановлением цитоподий и гломерулярной базальной мембраны [257]. Мутации в генах, кодирующих белки – регуляторы актинового цитоскелета (синаптоподин, α -актинин 4, нефрин, атипичный кадгерин 1 FAT и др.), приводят к протеинурии вследствие перестройки актинового цитоскелета и нарушения фильтрационного барьера [198; 230].

Накопление мезангиального матрикса, приводящее к гломерулосклерозу, является следствием дисбаланса между продукцией и деградацией матрикса и контролируется факторами роста и провоспалительными цитокинами [189]. Начальная фаза иммуноопосредованного гломерулярного воспаления зависит от взаимодействия иммунных комплексов со специфическими рецепторами в инфильтрирующих лейкоцитах и резидентных мезангиальных клетках, способности иммунных комплексов активировать систему комплемента, а также от местных воспалительных процессов. Активированные мезангиальные клетки затем производят множество медиаторов воспаления, что приводит к усилению повреждения клубочка [188].

Нефротический синдром или гломерулонефрит (т. е. нарушение функции клубочкового фильтра) может быть прямым результатом инфекции или накопления токсичных агентов в почках или генетических дефектов, связанных с подоцитами и гломерулярной базальной мембраной или может быть следствием вторичного повреждения вследствие декомпенсации хронического заболевания [256]. Генетические или приобретенные нарушения структуры подоцитов могут привести к сглаживанию цитоподий и цитотрабекул и слиянию подоцитов, что является морфологическим признаком протеинурии [294].

Наиболее распространенной причиной первичного заболевания клубочков у взрослых является фокальный сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), который определяется рубцеванием части клубочков (склероз). Как только целостность цитоподий подоцитов теряется, подоциты начинают отделяться от подлежащей гломерулярной базальной мембраны и обнажать участки поверхности капилляров клубочков. Эти участки гломерулярной базальной мембраны контактируют с

капсулой Боумена и образуют синехии, что является самым ранним признаком фокального сегментарного гломерулосклероза [130]. В ряде проведенных *in vivo* экспериментах было выявлено, что при повреждении менее 20 % подоцитов происходит восстановление структуры клубочка [214].

Тубулопатия характеризуется дистрофией эпителия канальцев вплоть до некроза, лейкоцитарной инфильтрацией и отеком стромы, клинически проявляется уремией. Проксимальные канальцы повреждаются в первую очередь при ишемическом и токсическом воздействии из-за своей высокой метаболической активности по осуществлению активного транспорта электролитов и микромолекул [46]. Повреждение провоцирует инфильтрацию ткани почки нейтрофилами, что приводит к образованию активных форм кислорода и активации макрофагов, дендритных клеток, лимфоцитов и тучных клеток, которые индуцируют выработку фиброгенных цитокинов и факторов роста, что приводит к ремоделированию тканей, в частности к фиброзу. Иммунные клетки учувствуют как в повреждении, так и в восстановлении структуры почки [82; 153; 264].

Нефроциты почечных канальцев наиболее чувствительны к патологическим процессам, ультраструктурные изменения можно увидеть уже через 15 минут после воздействия, наиболее подверженная изменениям структура – щеточная каемка, обеспечивающая процесс реабсорбции. В динамике происходит уменьшение числа инвагинаций плазмолеммы и количества свободных везикул [9].

Использование окрашивания периодической кислотой Шиффа (ШИК-реакция) для выявления исчезновения щеточной каемки на внутренней поверхности клеток проксимальных канальцев традиционно применяется для оценки острого тубулярного повреждения [46]. Ворсинки проксимальных канальцев имеют важное значение в увеличении поверхности реабсорбции и служат первой линией физической защиты поверхности просвета канальца. Щеточная каемка укорачивается или исчезает на внутренней поверхности клеток

проксимальных канальцев при остром повреждении канальцев или тубулярном некрозе [3].

Ультраструктурные повреждения почечного тельца можно обнаружить через 30 минут после воздействия, морфологически данные изменения проявляются в набухании базальных мембран и внутриклеточном отеке эндотелия клубочковых капилляров: увеличивается площадь цитоплазмы, митохондрии становятся округлыми, в гиалоплазме появляется большое количество свободных рибосом, в ядре хроматин конденсируется вокруг ядрышка. Патологические изменения подоцитов, выражающиеся в уплощении и увеличении толщины цитоподий и набухании органелл, можно заметить уже через 60 минут после воздействия [9].

Важную роль в патогенезе ОПП играет дисфункция митохондрий, что приводит к снижению окислительного фосфорилирования для обеспечения АТФ процессов реабсорбции и экскреции [111].

Известно, что длительное применение препаратов лития может вызвать структурные изменения в ткани почки. В исследовании Nestbech и соавторов у крыс, получавших литий в течение 9 недель были обнаружены очаговые корковые поражения проксимальных и дистальных извитых канальцев, сопровождаемые отеком и мононуклеарной инфильтрацией, при этом повреждений структуры клубочков и сосудов выявлено не было [145]. В клиническом исследовании, проведенном Netmar у пациентов, принимавших литий в течение 5–12 лет значительные гистопатологические изменения были обнаружены только у пациентов с острой интоксикацией литием, морфологические повреждения у пациентов без эпизодов интоксикации литием были незначительны. Также было выявлено влияние режима дозирования препарата лития на склеротические изменения клубочков и атрофию канальцев [147].

1.5 Белки-маркеры острого повреждения почек

В настоящее время активно ведется поиск чувствительных и специфических биомаркеров для выявления острого повреждения проксимальных канальцев в биопсийном и аутопсийном материале, а также в образцах крови и мочи [130].

KIM-1 (Kidney injury molecule 1) – представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа на поверхности эпителиальных клеток проксимальных канальцев, который, в основном, экспрессируется почками в условиях патологии [296]. Значительная корреляция между экспрессией KIM-1 и уровнем креатинина в сыворотке крови у взрослых пациентов указывает на то, что уровень экспрессии белка KIM-1 является чувствительным и специфичным маркером прижизненного повреждения проксимальных канальцев [46].

KIM-1 является важнейшим белком эпителия проксимальных канальцев, активность которого заметно повышается при большом количестве различных патологических процессов, как на животных моделях, так и у пациентов, и практически не экспрессируется здоровым почечным эпителием [164]. Эта молекула представляет собой трансмембранный белок 1-го типа с коротким цитоплазматическим доменом, имеющим сайты фосфорилирования тирозина, и внеклеточными муцин- и иммуноглобулиноподобными доменами, содержащими сайты N- и O -гликозилирования. Гликозилированный эктодомен расщепляется металлопротеиназами. Предполагается, что экспрессия KIM-1 в почках облегчает регенерацию эпителия после острого повреждения [253]. Было показано, что KIM-1 не только быстро активируется в проксимальных канальцах во время острого повреждения почек, но также экспрессируется при хроническом заболевании почек, которое в основном характеризуется тубулоинтерстициальными изменениями и фиброзом [195]. В ряде исследований было выявлено, что белок KIM-1 опосредует фагоцитоз апоптотических эпителиальных клеток, обеспечивая противовоспалительное и нефропротективное действие [163; 165]. Отмечается корреляция между укорочением края щеточной

каймы при проведении ШИК-реакции и повышением уровня экспрессии KIM-1 [296].

NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) представляет собой белок-член суперсемейства липокалинов, в настоящее время рассматривается как наиболее ранний маркер острого повреждения почек, его наличие обусловлено повреждением проксимальных и дистальных канальцев [239]. Липокалины связывают ряд лигандов и транспортируют небольшие молекулы к конкретным клеткам. Было показано, что они участвуют в транспорте ретинола, синтезе простагландинов, модуляции роста клеток и метаболизма, регуляции иммунного ответа, развитии тканей и регуляции поведения животных [269].

Мономерная и димерная формы NGAL продуцируются эпителиальными клетками канальцев, нейтрофилами, моноцитами, макрофагами и адипоцитами [270]. Основными лигандами NGAL являются сидерофоры – молекулы, связывающие железо. С одной стороны, сидерофоры синтезируются бактериями для приобретения железа, а NGAL оказывает бактериостатический эффект за счет истощения сидерофоров. С другой стороны, сидерофоры, продуцируемые эукариотами, участвуют в NGAL-опосредованном перемещении железа, что имеет решающее значение для различных клеточных ответов, таких как пролиферация и дифференцировка [110]. Молекула NGAL-содержащего железа взаимодействует с рецепторами на поверхности клетки, белок NGAL транспортируется в клетку и высвобождает железо. NGAL, не связанный с железом, также взаимодействует с рецепторами клеточной поверхности, что приводит к внутриклеточному переносу железа из клетки [186].

Биологические жидкости в равновесном состоянии содержат очень низкие уровни белка NGAL. Почечный клиренс является основным регулятором этого устойчивого уровня, поскольку циркулирующий NGAL подвергается клубочковой фильтрации из-за его низкой молекулярной массы и положительного заряда [205].

Уровень NGAL в плазме может повышаться из-за снижения клубочковой фильтрации, тогда как уровень NGAL в моче может быть значительно повышен

из-за снижения реабсорбции в проксимальных и дистальных канальцах [290]. NGAL является одним из наиболее экспрессируемых белков в почках после ишемического или токсического повреждения на животных моделях [149]. Было высказано предположение, что оценка уровня экспрессии NGAL является более точным прогностическим критерием для прогнозирования острого повреждения почек, чем оценка концентрации креатинина в сыворотке крови, при одновременном заборе материала и измерении данных маркеров [287]. Уровни NGAL в моче и сыворотке коррелировали с креатинином в сыворотке, а биопсия почек у пациентов с острым повреждением почек показала интенсивное накопление иммунореактивного NGAL в канальцах, подтверждая, что NGAL является чувствительным маркером острого повреждения почек у пациентов [104].

1.6 Заключение по литературному обзору

Анализ литературных данных свидетельствует, что нейтронозахватная терапия является перспективной опцией для лечения пациентов со злокачественными новообразованиями. Применение изотопа ${}^6\text{Li}$ для нейтронозахватной реакции имеет ряд преимуществ по сравнению с ${}^{10}\text{B}$, однако исследования по использованию лития для нейтронозахватной терапии проводились всего несколькими научными группами, и в этих исследованиях не оценивали накопление лития опухолью *in vivo*, более того, не известно, какие дозы лития будут эффективными для накопления препарата в опухоли в требуемой концентрации, и будут ли такие дозы токсичными для организма. Согласно современным литературным данным, наиболее распространенным побочным эффектом приема препаратов лития является повреждение почек. Наиболее часто повреждаются проксимальные эпителиальные канальцы и фильтрационный барьер почки, что ведет к острому почечному повреждению. Исходя из вышесказанного, можно заключить, что детальное исследование структуры почки и уровней экспрессии белков-маркеров острого повреждения

почек после введения препаратов лития в дозах, требуемых для литий-нейтронозахватной реакции, является актуальным и может быть использовано для разработки оптимального протокола литий-нейтронозахватной терапии.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1 Реагенты

Азотная кислота (HNO_3 69 %, «ос.ч.» 27–5, Panreac AppliChem, Германия); боркапнат натрия, обогащенный изотопом $^{10}\text{B} > 99,5$ % ($\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$, Katchem, Чехия) борфенилаланин, обогащенный изотопом $^{10}\text{B} > 99,5$ %, ($\text{C}_9\text{H}_{12}^{10}\text{BNO}_4$, Katchem, Чехия); гентамицин (Дальхимфарм, Россия); Гимза краситель (Sigma, США); диметилсульфоксид (NeoFroxx, Германия); лития карбонат (Li_2CO_3), лития цитрат ($\text{Li}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) и лития хлорид (LiCl) (Новосибирский завод редких металлов, Россия); МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид, Диа-М, Россия); одноэлементный стандартный раствор бора Boron Standart for ICP (Sigma-Aldrich); одноэлементный стандартный раствор лития Lithium (Li) CRISTAR® 1000 ppm Single Element Std. Soln. for ICP in HNO_3 (Central Drug House (P) Ltd, Индия); одноэлементный раствор иона лития ГСО 7780–2000 (Экологическое аналитическое объединение ЭАА «Экоаналитика», Россия); осмий тетроксид (OsO_4) (Sigma-Aldrich, США); параформальдегид (Sigma-Aldrich, США); перекись водорода (H_2O_2 37 %, Химмед, Россия); питательная среда DMEM/F12 (1:1) (Биолот, Россия); раствор натрия хлорида 0,9 % (физиологический раствор 0,9 %) (Гематек, Россия); раствор Хенкса (Биолот, Россия); стандартный образец массовой концентрации 1 мг/см^3 иона лития ГСО 7780–2000 (ЭАА «Эко-аналитика», Россия); толудиновый синий (Fluka, США); трипсин-версен (1:1) (Биолот, Россия); фетальная бычья сыворотка (HyClone, Logan, UT, США); формалин, 10 % раствор (Panreac AppliChem, Германия); цитрат свинца (Fluka, США); эпон (Serva, Германия); PBS (phosphate buffered saline – фосфатный солевой буфер в таблетках) (Росмедбио, Россия).

2.2.1 Клеточные культуры

Для оценки цитотоксичности препаратов и определения накопления клетками бора и лития использовали клеточную культуру меланомы кожи мыши В16, полученную в Институте цитологии и генетики СО РАН, а также клеточные культуры меланомы кожи человека SK-Mel-28 и дермальные фибробласты человека VJ-5ta (см. Рисунок 3), полученные в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН. Все использованные в данной работе клеточные культуры культивировали на среде DMEM/F12 (1 : 1) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и антибиотика гентамицина 50 мкг/мл при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе с дотацией 5 % CO₂. Пересевали клетки, используя раствор трипсин-версен (1 : 1), 2–3 раза в неделю в соотношении 1 : 3–1 : 5. При заполнении клетками более 90 % поверхности флакона, клетки отделяли с помощью раствора трипсин-версен по стандартной методике и пересевали в соответствии с дальнейшим экспериментом.

2.2.2 Колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток

Цитотоксичность препаратов бора и лития определяли при помощи колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток (МТТ-теста) [197]. Клетки высевали в 96-луночный планшет (Thermo Fisher Scientific, США) по $4 \cdot 10^4$ клеток на лунку и инкубировали 24 часа. Затем в лунки добавляли препараты бора и лития в диапазоне концентраций элементов в растворе от 10 до 640 мкг/мл. Планшеты инкубировали в течение 24 часов. Лунки с клетками со средой без препарата были приняты за контроль. Затем среду с препаратом заменяли на среду без сыворотки и добавляли 10 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл в каждую лунку. Планшеты инкубировали еще 4 часа в стандартных условиях, после чего среду заменяли на ДМСО в объеме 100 мкл на лунку с последующей инкубацией в течение 5 мин. при температуре 37°C в

термостате. Оптическую плотность растворов определяли на планшетном спектрофотометре Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 595 нм. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{Выживаемость (\%)} = \text{ОП}_{\text{оп.}} / \text{ОП}_{\text{конт.}} \times 100 \%, \quad (1)$$

где $\text{ОП}_{\text{оп}}$ – оптическая плотность в опытной группе;

$\text{ОП}_{\text{конт}}$ – оптическая плотность в контрольной группе.

2.2.3 Клоногенный анализ

Анализ влияния препаратов лития на пролиферативную активность опухолевых клеточных культур и фибробластов проводили при помощи клоногенного анализа [92]. Клетки инкубировали в культуральных флаконах с площадью ростовой поверхности 25 см^2 (Jet Biofil, Китай), в логарифмическую фазу роста среду заменили на среду, содержащую препараты лития с конечной концентрацией лития в культуральной среде 40 мкг/мл и инкубировали 24 часа, контрольную группу культивировали без препаратов. Затем клетки отделяли от пластика при помощи раствора фосфатного солевого буфера и трипсина-версена, количество клеток в суспензии подсчитывали при помощи автоматического счетчика клеток Countess Cell Count (Invitrogen) и высевали по 200 клеток на лунку 6-луночного культурального планшета (Thermo Fisher Scientific, США) по 3 повтора для каждой экспериментальной точки. На 8–12-е сутки в зависимости от культур клеток планшеты промывали раствором PBS, клетки фиксировали 10 % раствором формалина (Panreac AppliChem, Германия) и окрашивали раствором Гимза (Sigma, США). Колонии, содержащие более 50 клеток, подсчитывали визуально при помощи светового инвертированного микроскопа Zeiss Primo Vert (Германия). Долю выживших клеток в опытных группах рассчитывали с учетом выживаемости в контроле, используя формулу:

$$\text{Доля выживших клеток (\%)} = K_{\text{оп.}}/K_{\text{конт.}} \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где $K_{\text{оп}}$ – среднее количество колоний в опытной группе;

$K_{\text{конт}}$ – среднее количество колоний в контрольной группе.

2.2.4 Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

Оценку концентраций бора и лития в нормальных и опухолевых клетках *in vitro* оценивали с помощью атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС ИСП). Клетки инкубировали в культуральных флаконах с площадью поверхности 25 м² (JET Biofil, Китай). В логарифмическую фазу роста среду меняли на среду, содержащую препараты бора или лития, с конечной концентрацией бора или лития в культуральной среде 40 мкг/мл, далее флаконы культивировали в стандартных условиях в течение 24 часов. Контрольные образцы культивировали без препаратов бора или лития. Клетки отмывали в растворе фосфатного солевого буфера и снимали с пластика при помощи раствора трипсин-версен. Пробоподготовку образцов проводили в центрифужных пробирках с неплотно завинченной крышкой объемом 15 мл методом мокрого озоления с использованием концентрированной азотной кислоты HNO₃ (х.ч., 69 %) при температуре 90°C в системе нагревания Dry Block Heater 2 (IKA, Germany). Объем проб довели до 7 мл деионизованной водой. Измерение концентрации бора и лития проводили методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на спектрометре высокого разрешения ICPE-9820 (Shimadzu, Япония). Градуировочные зависимости строили с использованием одноэлементного стандартного раствора бора Boron Standart for ICP или лития Lithium (Li) CRISTAR® Single Element Std. Soln. for ICP в диапазоне 0,01–10 мг/л. Результат анализа получали усреднением по четырем аналитическим линиям для бора и по трем аналитическим линиям для лития. Для

получения итоговой концентрации бора или лития в клетках использовали формулу: измеренная концентрация \times объем образца/количество клеток $\times 10^6$.

2.3 Эксперимент *in vivo*

Работы *in vivo* выполнены на мышах-самцах линии C57BL/6 массой 20–22 г в возрасте 10–12 недель. Животных содержали в виварии Института цитологии и генетики СО РАН в стандартных условиях, при температуре 22–26°C и световом режиме свет/темнота 12/12, на стандартной диете, вода и пища животным предоставлялись *ad libitum*. Для моделирования опухолевого процесса каждому животному инокулировали суспензию, содержащую 1 млн клеток меланомы кожи мыши В16 подкожно в правую паховую область. Все эксперименты на лабораторных животных были выполнены с соблюдением принципов гуманного отношения к животным в соответствии с директивой Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и одобрены Этическим комитетом НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН (№ 156, 27.02.2020).

Через 10 суток после инокуляции опухолевых клеток животные случайным образом были разделены на 11 групп (по 5 мышей в каждой): контрольная группа; 5 групп мышей, получавших лития карбонат в дозе 300 мг/кг и 5 групп мышей, получавших лития карбонат в дозе 400 мг/кг. Препарат вводили в 50 мкл натрия хлорида 0,9 % однократно перорально. Животных выводили из эксперимента методом краниоцервикальной дислокации через 15 мин., 30 мин., 90 мин., 180 мин. и 7 дней после введения лития карбоната с последующим забором биологического материала (кровь, кожа, почки, головной мозг и опухоль). Забор кожи осуществляли с отступом в 2 мм от края резекции опухоли. Для оценки токсического эффекта лития карбоната проводили сравнение массы тела животных контрольной и опытных групп на всех временных точках.

2.3.1 Анализ биораспределения лития

Для измерения концентраций лития в опухоли, коже, крови, почке и головном мозге использовали метод АЭС ИСП. Пробоподготовка органов и тканей осуществлялась методом мокрого озоления. К навеске с заранее известной массой добавляли концентрированную азотную кислоту HNO_3 (х.ч., 69 %) и перекись водорода H_2O_2 (37 %). В системе Dry Block Heater 2 (ИКА, Германия) пробы в центрифужных пробирках объемом 15 мл с неплотно завинченной крышкой нагревали до температуры 90°C до растворения образца и получения прозрачного раствора. Объем каждой пробы доводили до 8 мл деионизованной водой. Содержание лития определяли методом АЭС ИСП на спектрометре высокого разрешения ICPE-9820 (Shimadzu, Япония). Пробы вводили при помощи перистальтического насоса. Градуировочные зависимости строили с использованием сертифицированного одноэлементного раствора иона лития ГСО 7780–2000. Результат анализа получали усреднением по трем аналитическим линиям. Для получения итоговой концентрации лития в опухоли и органах использовали формулу: измеренная концентрация \times объем образца/вес органа.

Фармакокинетические параметры C_{\max} , TC_{\max} , AUC, AUMC были рассчитаны для каждой группы образцов с использованием некомпартментных методов в программе PKSolver версии 2.0. (Pharsight, Mountain View, CA, USA). C_{\max} (максимальная концентрация) – пиковое значение концентрации лития в опухоли, органе и крови после приема препарата, TC_{\max} – время достижения максимальной концентрации лития опухоли, органе и крови. C_{\max} и TC_{\max} получены непосредственно из профилей зависимости концентрации от времени. AUC_{0-t} (area under the curve – площадь под фармакокинетической кривой с момента введения лития карбоната до последней определяемой концентрации на временной точке) характеризует суммарную концентрацию лекарственного препарата в плазме крови в течение всего времени наблюдения. $AUMC_{0-t}$ (area under the moment curve – площадь под кривой первого момента) отражает общую площадь под кривой первого момента, при котором параметры

концентрация \times время отображаются в зависимости от времени, данные параметры рассчитывали с использованием трапециевидных методов.

2.3.2 Световая микроскопия

Для исследования методом световой микроскопии образцы почки фиксировали в 4 % растворе параформальдегида (BioVitrum, Россия) в течение 24 часов. Биологический материал обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, обезжировали в ксилоле и заливали в парафин по общепринятой гистологической методике [1]. Гистологические срезы толщиной около 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific, Германия). С каждого блока получали 3–4 среза, окрашивали их гематоксилином и эозином (BioVitrum, Россия) по стандартной методике. Изображения для анализа получали на микроскопе Axio Scope. A1 (ZEISS, Германия) с использованием CCD камеры AxioCam 512 color (ZEISS, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.3 (ZEISS, Германия) Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. На цифровых микрофотографиях оценивали патоморфологические изменения эпителия проксимальных канальцев и клубочков, наличие отека и инфильтрата, анализировали реакцию сосудов микроциркуляторного русла.

2.3.3 ШИК-реакция

Парафиновые срезы почки были окрашены с использованием периодической кислоты Шиффа (ШИК-реакция, Periodic Acid Schiff reaction, PAS-реакция). Морфология почки оценивалась путем анализа специфического окрашивания гликогена с помощью компьютерной программы ImageJ (Wayne Rasband, США).

2.3.4 Трансмиссионная электронная микроскопия

Для исследования в электронном микроскопе фрагменты почки размером до 1 мм^3 фиксировали в 4 % растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 часа в 1 % растворе OsO_4 на фосфатном буфере, дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпоксидную смолу эпон (Serva, Германия). Из полученных блоков на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия) готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым синим, с помощью светового микроскопа LEICA DME (Leica Microsystems, Германия) отбирали образцы для исследования в электронном микроскопе. Ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца. Электронные микрофотографии были получены увеличении $\times 30\,000$ при 80 кВ на электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

2.3.5 Иммуногистохимия

Для иммуногистохимического исследования образцы почки фиксировали в 4 % растворе формальдегида, обрабатывали по стандартной гистологической методике и заливали в парафин. Далее, срезы ткани депарафинизировали в серии спиртов понижающей концентрации, регидратировали и подвергали процедуре раскрытия антигена в микроволновой печи в растворе цитратного буфера (pH 6.0). Затем, после блокировки неспецифического связывания, срезы гибридизировали с первичными кроличьими поликлональными антителами к NGAL (Cloud-clone corp., Китай) и к Kim-1 (Cloud-clone corp., Китай) в течение ночи при плюс $4\text{ }^\circ\text{C}$ и далее с соответствующими вторичными поликлональными антителами козла к IgG кролика (Abscam, Великобритания), конъюгированными с пероксидазой хрена в течение 1 ч. при плюс $25\text{ }^\circ\text{C}$. После гибридизации, срезы отмывали,

контрастировали раствором гематоксилина, дегидратировали и заключали в монтирующую среду. Изображения получали на микроскопе Axio Scope. A1 (ZEISS, Германия) с использованием CCD камеры AxioCam 512 color (ZEISS, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.3 (ZEISS, Германия) Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

2.3.6 Морфометрия и статистический анализ

Для морфометрии срезов почки, окрашенных периодической кислотой Шиффа, было отобрано не менее 10 полей зрения с каждой группы при финальном увеличении $\times 400$. Цифровые микрофотографии получали на микроскопе Axio Scope. A1 (ZEISS, Германия) с использованием CCD камеры AxioCam 512 color (ZEISS, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.3 (ZEISS, Германия) центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Морфометрический анализ электроннограмм проводили с помощью компьютерной программы ImageJ (Wayne Rasband, США). Клетки морфометрировали при увеличении в 30000 раз. Определяли число fenestr в эндотелии гломерулярных капилляров и количество ножек подоцитов в пределах 2 микрон клубочковой базальной мембраны. Также с помощью масштабной линейки измеряли толщину гломерулярной мембраны и базальной мембраны эпителиоцитов проксимальных канальцев, толщину ножек подоцитов и размер щелевой диафрагмы.

Морфометрию цифровых изображений ($n = 15$ полей зрения/группа), полученных в результате иммуногистохимического окрашивания, проводили с помощью программного обеспечения Image J (Wayne Rasband, США). Окрашенные срезы опухоли оценивали с использованием иммунореактивной шкалы, как описано ранее [173]. Площадь и интенсивность положительного окрашивания цитоплазмы оценивали по балльной системе. Площадь окрашивания

оценивалась как «0» (< 1 %), «1» (1–25 %), «2» (> 25–50 %), «3» (> 50–75 %) или «4» (> 75 %). Интенсивность окрашивания оценивали, как «0» (отсутствие окрашивания), «1» (слабое окрашивание), «2» (умеренное окрашивание) или «3» (сильное окрашивание). Суммарный балл экспрессии Kim-1 и NGAL рассчитывали по формуле: площадь × интенсивность окрашивания.

Статистическая обработка полученных данных произведена в программе Microsoft Excel (Microsoft, США) и Statistica 10.0 (StatSoft, США). Количественные данные представлены в виде среднего (M – mean) и стандартного отклонения (SD – standard deviation) в виде ($M \pm SD$). Для попарного сравнения независимых групп использовали U-критерий Манна – Уитни (непараметрическая статистика). Различия считали значимыми при уровне достоверности 95 % ($P < 0,05$).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Результаты экспериментальных работ *in vitro*

3.1.1 Оценка цитотоксичности препаратов бора на клетках меланомы

Морфология использованных в работе клеточных культур представлена на рисунке 5. Клеточная культура фибробластов человека BJ-5ta состояла из крупных фибробластоподобных клеток. Клеточная линия меланомы кожи человека SK-Mel-28 была представлена полигональными эпителиоподобными клетками. Клеточная культура меланомы кожи мыши B16 характеризовалась наличием как веретенообразных, так и эпителиоподобных опухолевых клеток. Все описанные выше клеточные культуры являются иммортализованными адгезивными культурами, культивируемыми монослойным способом.

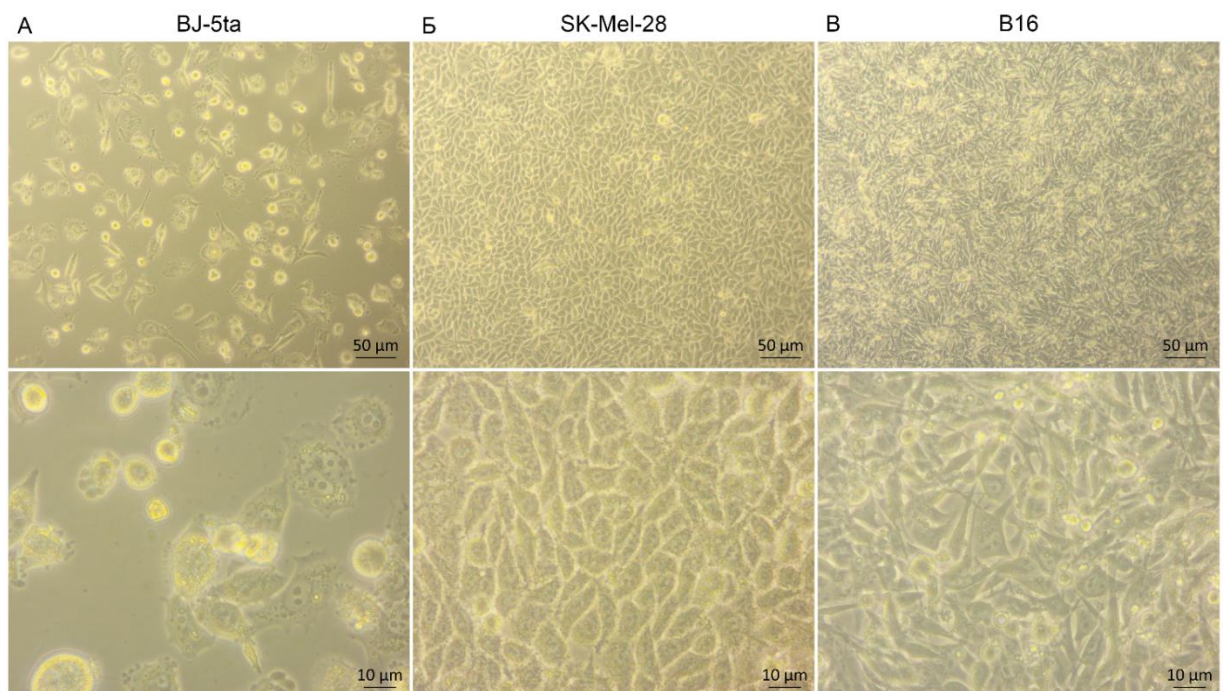
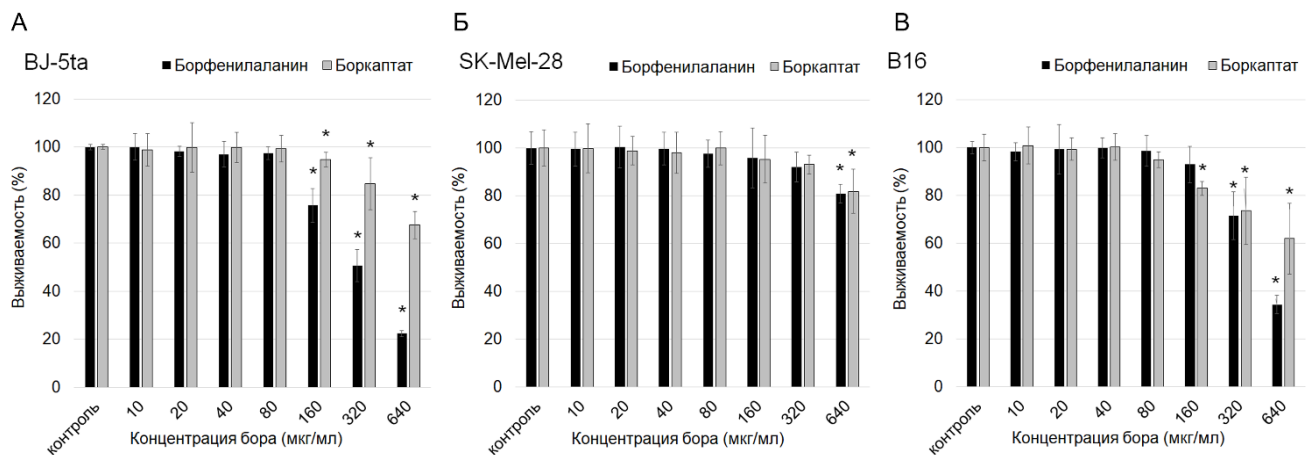


Рисунок 5 – Морфология клеточных культур BJ-5ta, SK-Mel-28 и B16.

Увеличение $\times 100$ (верхняя панель), $\times 400$ (нижняя панель)

Цитотоксичность препаратов бора, применяемых в клинических исследованиях борфенилаланина и боркаптата *in vitro* определяли с помощью МТТ-теста (Рисунок 6). Культуры клеток меланомы кожи человека, меланомы кожи мыши и дермальные фибробласты человека культивировали с препаратами в течение 24 часов. Максимальная нетоксичная концентрация бора для дермальных фибробластов VJ-5ta составила 80 мкг/мл, выживаемость клеток в опытной группе достоверно снизилась относительно контрольной при концентрации бора 160 мкг/мл (выживаемость составила 75,7 % при инкубации с борфенилаланином ($p = 0,009$) и 94,8 % – с боркапталом ($p = 0,047$).

Схожие результаты были получены для культуры V16: при инкубации с боркапталом выживаемость клеток достоверно снижалась при повышении концентрации до 160 мкг/мл ($p = 0,009$). Цитотоксическое действие борфенилаланина проявлялось при концентрации бора 320 мкг/мл, при этом выживаемость клеток составила 71,6 % ($p = 0,009$).



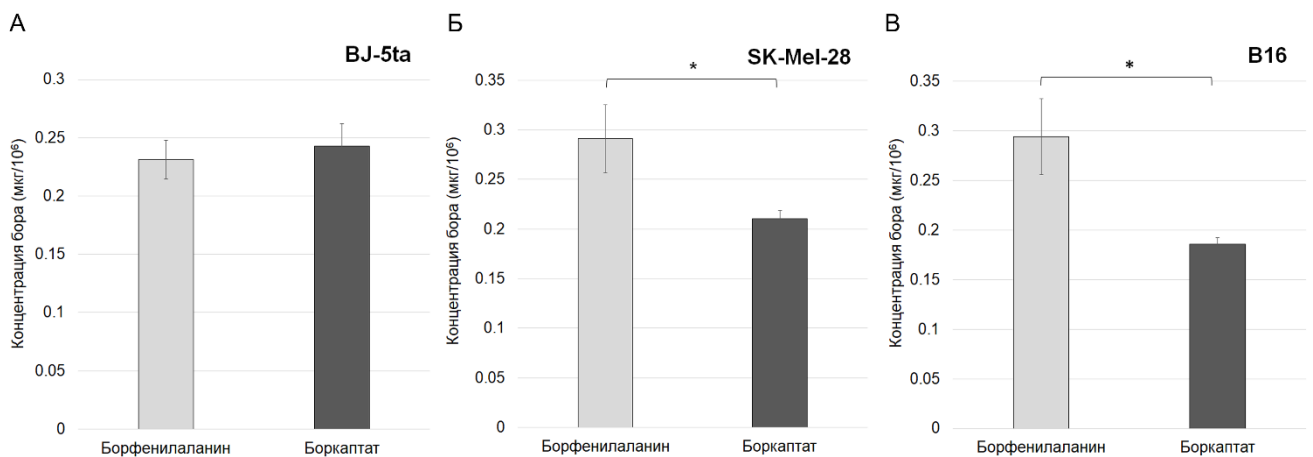
Примечание – *($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля; данные представлены как ($M \pm SD$) ($n = 5$)

Рисунок 6 – Цитотоксичность борсодержащих препаратов борфенилаланина и боркаптата в различных концентрациях бора для клеточных культур VJ-5ta, SK-Mel-28 и V16, МТТ-тест

Препараты бора не оказывали токсического действия на клеточную культуру SK-Mel-28 в диапазоне концентраций бора 10–320 мкг/мл, достоверные отличия в выживаемости клеток были получены при воздействии борфенилаланина ($p = 0,009$) и боркаптата ($p = 0,028$) в концентрации 640 мкг/мл.

3.1.2 Анализ накопления бора в клетках меланомы

Эффективность накопления бора нормальными и опухолевыми клетками проводили при помощи АЭС-ИСП (Рисунок 7). Максимальная концентрация была обнаружена при инкубации клеток SK-Mel-28 и В16 с борфенилаланином и составила $0,29 \text{ мкг}/10^6$ клеток, при инкубации с боркаптатом концентрация бора составила $0,21 \text{ мкг}/10^6$ клеток для культуры SK-Mel-28 и $0,19 \text{ мкг}/10^6$ клеток для В16. Накопление бора дермальными фибробластами VJ-5ta достоверно не зависело от препарата и составило $0,23$ и $0,24 \text{ мкг}/10^6$ клеток для борфенилаланина и боркаптата, соответственно.



Примечание – данные представлены как ($M \pm SD$) ($n = 3$).

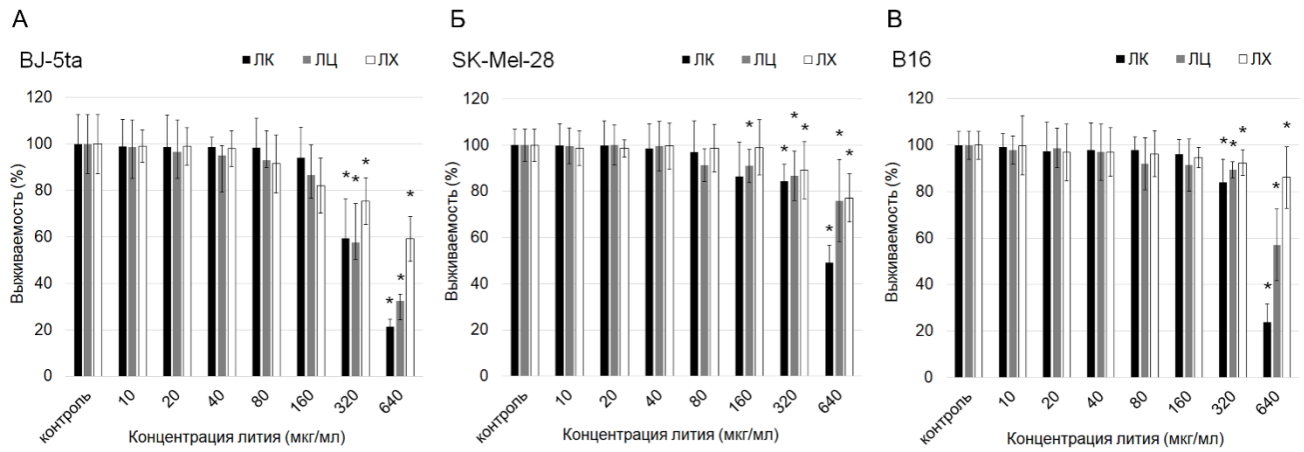
Рисунок 7 – Анализ концентрации бора в клетках VJ-5ta, SK-Mel-28 и V16 через 24 часа инкубации с борсодержащими препаратами

3.1.3 Оценка цитотоксичности солей лития на клетках меланомы

Цитотоксичность солей лития *in vitro* оценивали с помощью МТТ-теста после инкубации клеток с препаратом в течение 24 часов (Рисунок 8). Лития карбонат не оказывал токсического действия на все клеточные линии в диапазоне концентраций лития 10–160 мкг/мл. Выживаемость клеток в опытных группах достоверно отличалась от таковой в контрольных группах при концентрации лития 320 мкг/мл ($p = 0,021$) для ВJ-5ta; ($p = 0,004$) для SK-Mel-28 и ($p = 0,018$) для В16. Наиболее выраженный цитотоксический эффект наблюдался при максимальной вводимой концентрации лития 640 мкг/мл, выживаемость клеток ВJ-5ta составила 21 %, В16 – 24 %, SK-Mel-28 – 49 %.

Лития цитрат не оказывал токсического эффекта на клеточные культуры ВJ-5ta и В16 в диапазоне концентраций лития 10–160 мкг/мл, для культуры SK-Mel-28 концентрация 160 мкг/мл достоверно уменьшала процент выживаемости клеток по сравнению с интактным контролем ($p = 0,0476$).

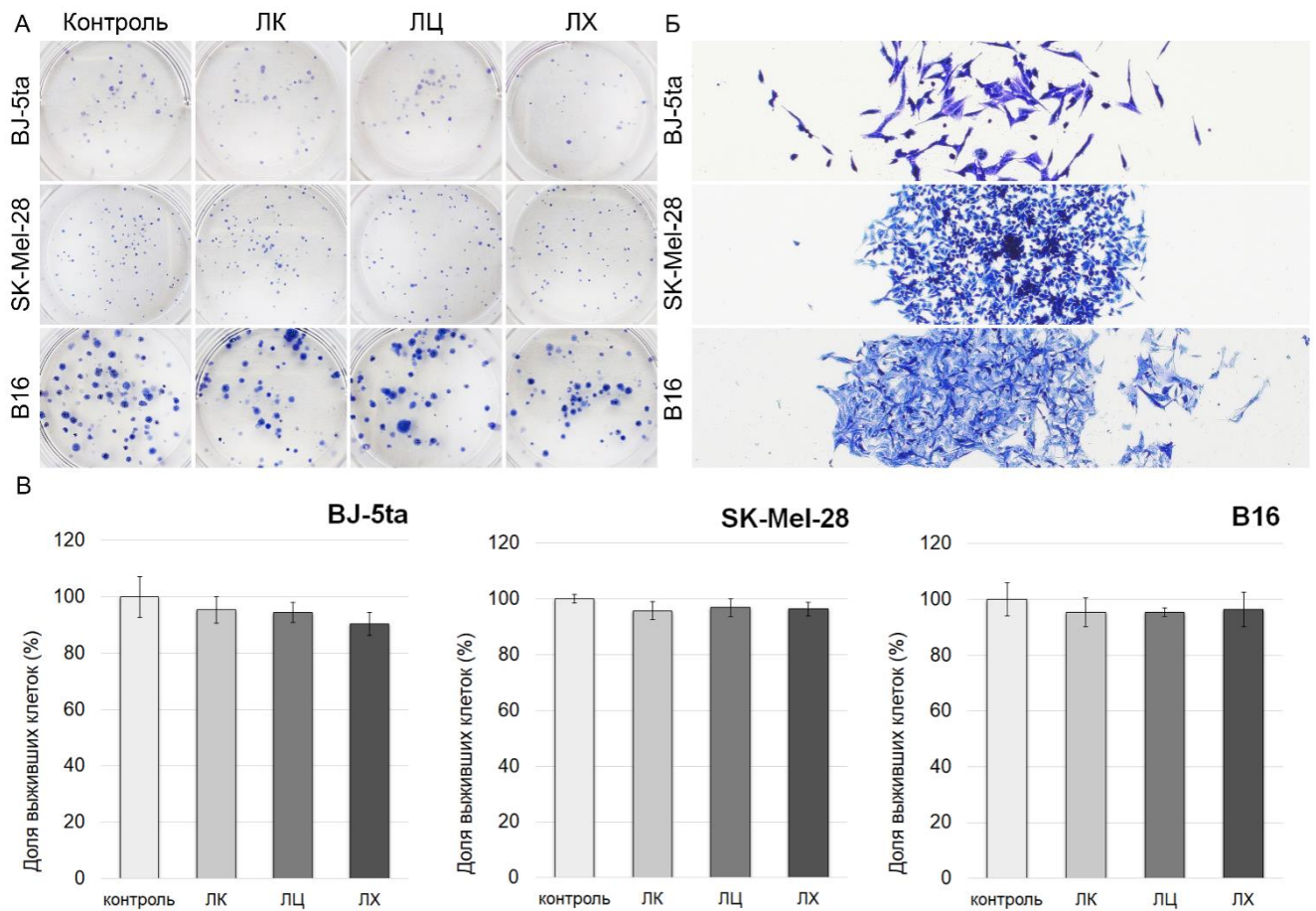
Аналогичные результаты были получены с применением лития хлорида – выживаемость клеток трех культур при воздействии концентраций лития в диапазоне 10–160 мкг/мл не отличалась от данных выживаемости в контрольных группах. Выживаемость клеток В16 при воздействии лития хлорида в концентрации лития 320 мкг/мл снизилась до 92,5 %, что достоверно не отличалось от контроля, однако лития хлорид в этой же концентрации лития оказывает цитотоксический эффект на 2 другие клеточные культуры – выживаемость ВJ-5ta 75,5 % и SK-Mel-28 – 89 %.



Примечание – * $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля; данные представлены как ($M \pm SD$) ($n = 5$); ЛК – лития карбонат; ЛЦ – лития цитрат, ЛХ – лития хлорид.

Рисунок 8 – Цитотоксичность солей лития в различных концентрациях лития для клеточных культур VJ-5ta, SK-Mel-28 и B16, МТТ-тест

Анализ пролиферативной активности клеточных культур после инкубации с солями лития в концентрации лития 40 мкг/мл в течение 24 часов проводили при помощи клоногенного теста (Рисунок 9). Достоверных отличий между долей выживших клеток в опытных и контрольных группах выявлено не было.

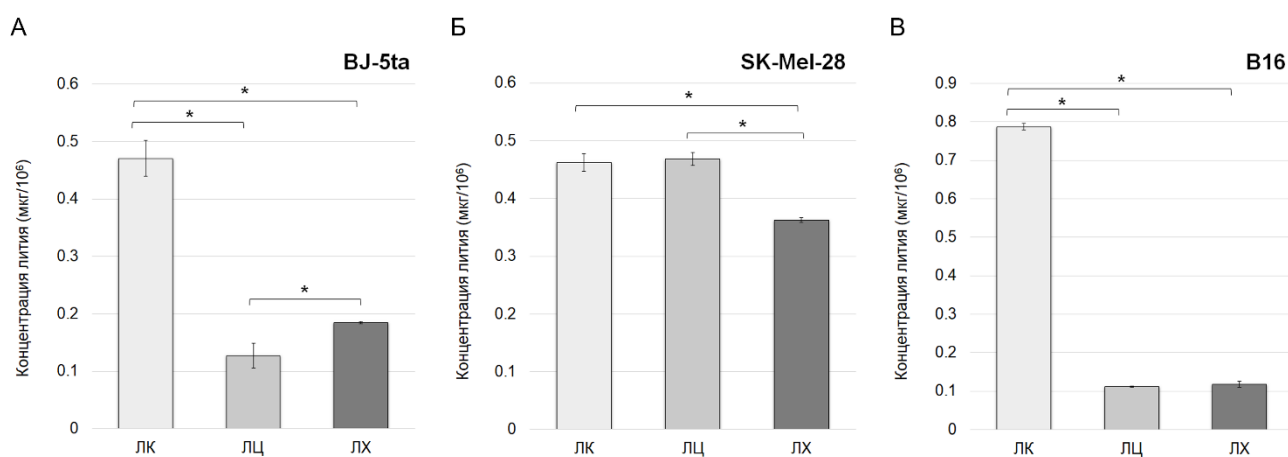


Примечание – * $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля; данные представлены как ($M \pm SD$) ($n = 3$); ЛК – лития карбонат; ЛЦ – лития цитрат, ЛХ – лития хлорид.

Рисунок 9 – Оценка колониобразующей способности клеточных культур BJ-5ta, SK-Mel-28 и B16 через 8–12 суток после инкубации с солями лития, клоногенный тест. Лунки после окрашивания красителем Гимза (А), сформированные клеточные колонии, окраска клеток с помощью красителя Гимза, увеличение $\times 100$ (Б), результат клоногенного теста – процент выживших клеток, образовавших колонии, относительно контрольной группы (В)

3.1.4 Анализ накопления лития в клетках меланомы

Определение концентрации лития в клетках после инкубации с солями лития с концентрацией лития в культуральной среде 40 мкг/мл в течение 24 часов было выполнено при помощи АЭС ИСП (Рисунок 10). Наибольшая концентрация лития в клетках VJ-5ta была обнаружена при инкубации с лития карбонатом и составила 0,47 мкг/10⁶ клеток, при инкубации данной клеточной культуры с лития цитратом и лития хлоридом концентрация лития составила 0,12 и 0,18 мкг/10⁶ клеток соответственно. Концентрация лития в клетках SK-Mel-28 составила 0,46, 0,47 и 0,36 мкг/10⁶ клеток при инкубации в культуральной среде с лития карбонатом, лития цитратом и лития хлоридом соответственно. Максимальные значения накопления лития были получены для культуры B16 при инкубации с лития карбонатом: концентрация лития составила 0,79 мкг/10⁶ клеток, однако две другие соли накапливались менее интенсивно (0,11 и 0,12 мкг лития/10⁶ клеток при инкубации с лития цитратом и лития хлоридом соответственно).



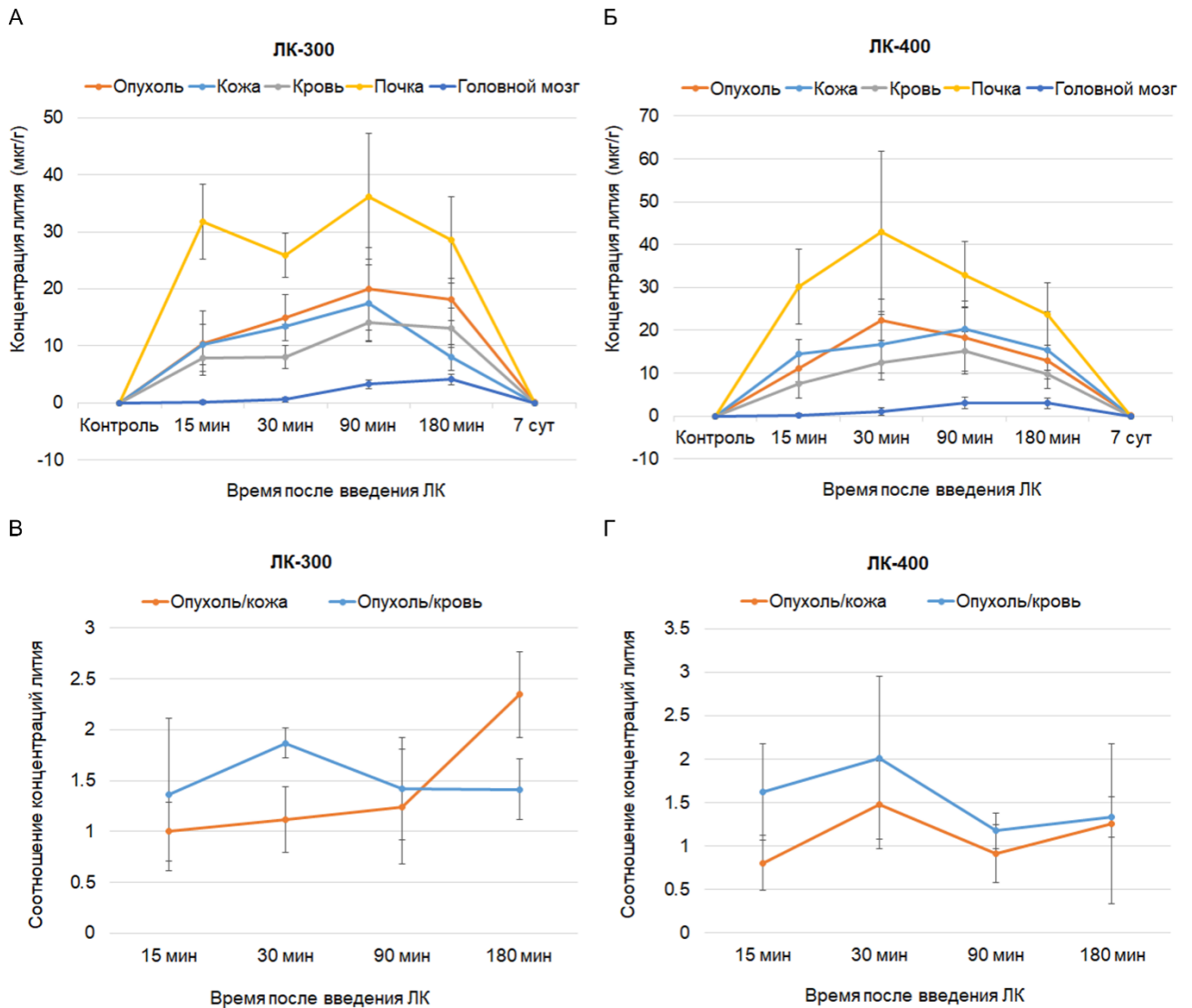
Примечание – данные представлены как (M ± SD) (n = 3); ЛК – лития карбонат; ЛЦ – лития цитрат; ЛХ – лития хлорид.

Рисунок 10 – Анализ концентрации лития в клетках VJ-5ta, SK-Mel-28 и B16 через 24 часа инкубации с солями лития

3.2 Результаты экспериментальных работ *in vivo*

3.2.1 Изучение биораспределения лития в опухоли, коже, крови, почках, головном мозге

Измерение содержания лития в опухоли, коже, крови, почках и головном мозге проводили для каждой временной точки при помощи метода АЭС ИСП (Рисунок 11 А, Б). Соотношение концентраций лития опухоль/нормальная ткань (кожа) и опухоль/кровь было рассчитано для каждой временной точки и для двух доз лития карбоната (Рисунок 11 В, Г). Эффективность накопления лития в опухоли была наиболее высокой на временной точке 30 минут в группе ЛК-400 и составила $(22,4 \pm 4,9)$ мкг/г. Соотношение опухоль/кожа на этой временной точке составило 1,5; соотношение опухоль/кровь – 2. Для группы ЛК-300 максимальное накопление лития в опухоли было зарегистрировано через 90 минут после введения препарата и составило $(20,02 \pm 7,24)$ мкг/г, соотношение концентраций лития в образцах опухоли и кожи варьировало в диапазоне от 1 до 2,3; в образцах опухоли и крови – от 1,4 до 1,9. Статистически достоверных отличий между группами, получавшими лития карбонат в дозе 300 мг/кг и 400 мг/кг определено не было. Наибольшие концентрации лития были обнаружены в образцах почки (до 43 мкг/г). Содержание лития в головном мозге было низким на всех временных точках и не превышало 4,1 мкг/г. Эксперимент показал, что концентрация лития во всех изученных образцах снизилась до фоновых значений через 7 суток после однократного введения лития карбоната.



Примечание – данные представлены как ($M \pm SD$) ($n = 5$).

Рисунок 11 – Результаты исследования биораспределения лития в опухоли, коже, крови, почках и головном мозге (А, Б) и соотношение концентраций лития опухоль/кожа и опухоль/кровь (В, Г) в динамике после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) (А, В) и 400 мг/кг (ЛК-400) (Б, Г) мышам с имплантированной меланомой В16

Фармакокинетические параметры C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} , $AUMC_{0-t}$ рассчитывали для каждой экспериментальной группы с использованием некомпартментных методов в программе PKSolver 2.0 (таблица 2). Максимальная концентрация лития в опухоли после введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг составила

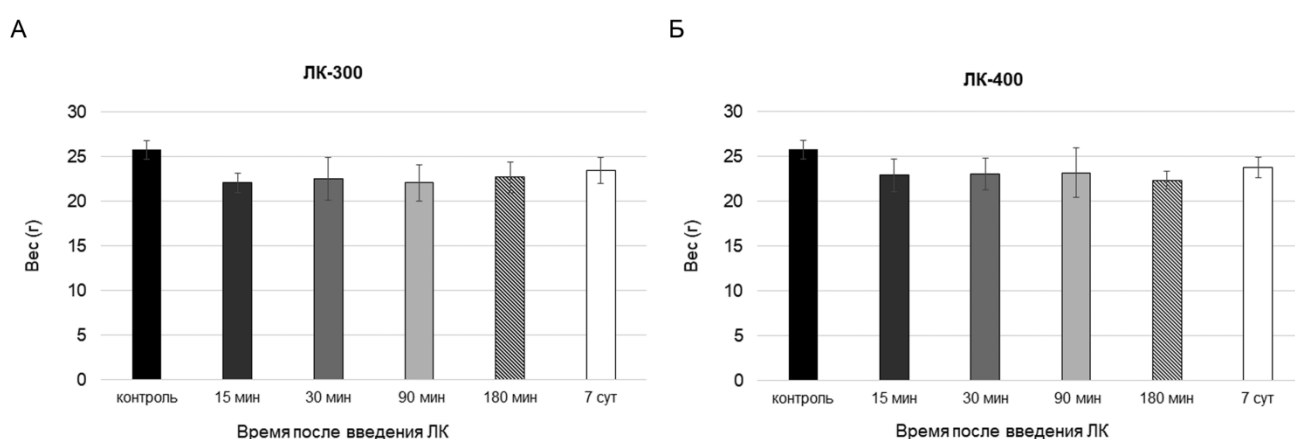
($22,4 \pm 4,9$), T_{\max} составило 30 минут C_{\max} в опухоли после введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг была равна ($20,0 \pm 7,2$), T_{\max} составило 90 минут. Различий в достижении T_{\max} для крови и кожи выявлено не было. T_{\max} в почках после введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг было в 3 раза больше, чем после введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг, а в головном мозге – в 2 раза больше. Статистически значимых различий между AUC_{0-t} и $AUMC_{0-t}$ в экспериментальных группах, получавших лития карбонат в дозах 300 мг/кг и 400 мг/кг обнаружено не было.

Таблица 2 – Фармакокинетические параметры биораспределения лития после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) и 400 мг/кг (ЛК-400) мышам с имплантированной меланомой В16

Органы					
параметр	опухоль	кожа	кровь	почка	головной мозг
ЛК-300					
$^1C_{\max}$	$20,02 \pm 7,24$	$17,46 \pm 6,76$	$14,12 \pm 3,15$	$36,18 \pm 11,02$	$4,12 \pm 0,92$
$^2T_{\max}$	90	90	90	90	180
$^3AUC_{0-t}$	$3033,37 \pm 946,46$	$2326,01 \pm 675,46$	$2067,3 \pm 504,18$	$5448,69 \pm 1520,44$	$458,13 \pm 120,88$
$^4AUMC_{0-t}$	$300882,07 \pm 84457,77$	$199903,52 \pm 64963,1$	$212511,15 \pm 52240,97$	$511801,2 \pm 142845,8$	$56393,04 \pm 13198,91$
ЛК-4					
$^1C_{\max}$	$22,41 \pm 4,86$	$20,34 \pm 5,1$	$15,12 \pm 4,63$	$43,04 \pm 18,69$	$3,1 \pm 1,33$
$^2T_{\max}$	30	90	90	30	90
$^3AUC_{0-t}$	$2964,30 \pm 961,36$	$3063,18 \pm 1096,22$	$2157,99 \pm 593,07$	$5611,01 \pm 1741,98$	$2157,99 \pm 593,07$
$^4AUMC_{0-t}$	$256485,72 \pm 81014,87$	$283785,63 \pm 115900,11$	$197089,64 \pm 44734,13$	$470407,68 \pm 134435,73$	$197089,64 \pm 44734,13$
Примечания:					
1. данные представлены как ($M \pm SD$) ($n = 5$);					
2. $^1C_{\max}$ (мкг/г; мкг/мл); $^2T_{\max}$ (мин); $^3AUC_{0-t}$ (мин \times мкг/г; мин \times мкг/мл); $^4AUMC_{0-t}$ (мин \times мкг/г ² ; мин \times мкг/мл).					

3.2.2 Анализ изменения веса животных после введения лития карбоната для определения острой токсичности

Для оценки токсического эффекта лития карбоната было проведено сравнение между весом животных из опытных и контрольной групп (Рисунок 12). Было выявлено незначительное снижение веса тела мышей, получивших лития карбонат, однако статистически значимых различий между опытными группами и контрольной группой обнаружено не было.



Примечание: Данные представлены как ($M \pm SD$) ($n = 5$).

Рисунок 12 – Вес тела мышей с B16 меланомой после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300, А) и 400 мг/кг (ЛК-400, Б).

3.2.3 Оценка структурных изменений почки при введении лития карбоната

Для морфологической оценки структурных изменений почки после введения лития карбоната в дозах 300 и 400 мг/кг было выполнено окрашивание срезов почки гематоксилином и эозином.

В контрольной группе мышей с отдаленным опухолевым ростом визуализировались сосуды неравномерного кровенаполнения, с более

выраженным полнокровием сосудов микроциркуляторного русла и вен; величина клубочков не изменялась, капилляры клубочков равномерно кровенаполнены (Рисунок 13). В части клубочков просматривалось расширение пространства капсул, обусловленное отёком гломерул, капсулы были свободные. Эпителий проксимальных канальцев эозинофильной окраски, отмечалось его набухание и незначительное уменьшение просвета канальцев. Наблюдался неровный апикальный край эпителиоцитов и клетки со слегка мутноватой зернистой цитоплазмой за счет накопления в ней включений – зерен белка эозинофильной окраски. Ядра эпителия проксимальных и дистальных канальцев были хорошо контурированы, базофильной окраски. Часть эпителиоцитов была лишена ядер, а сами клетки частично деструктурированы.

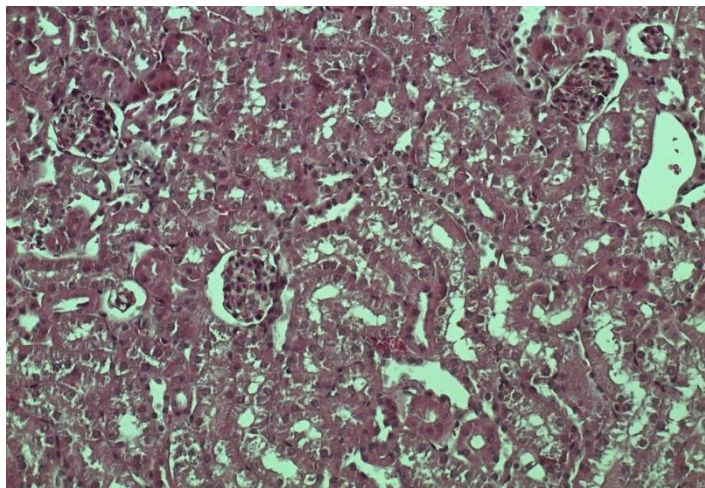


Рисунок 13 – Срезы почки в контрольной группе. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

В почках мышей через 15 минут после однократного введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг были выявлены сосуды микроциркуляторного русла неравномерного кровенаполнения, в капиллярах отмечали сладжирование эритроцитов; величина клубочков не изменялась, капилляры клубочков были равномерно кровенаполнены (Рисунок 14 А). В части клубочков просматривалось расширение пространства капсул (отёк гломерул), капсулы были свободные.

Визуализировали высокий, набухший эпителий проксимальных канальцев эозинофильной окраски, просвет канальцев во многих полях зрения был не различим (отёк). Определялся эпителий дистальных канальцев со светлой цитоплазмой, просвет канальцев был четко различим. Ядра эпителия проксимальных и дистальных канальцев были хорошо контурированы, базофильной окраски.

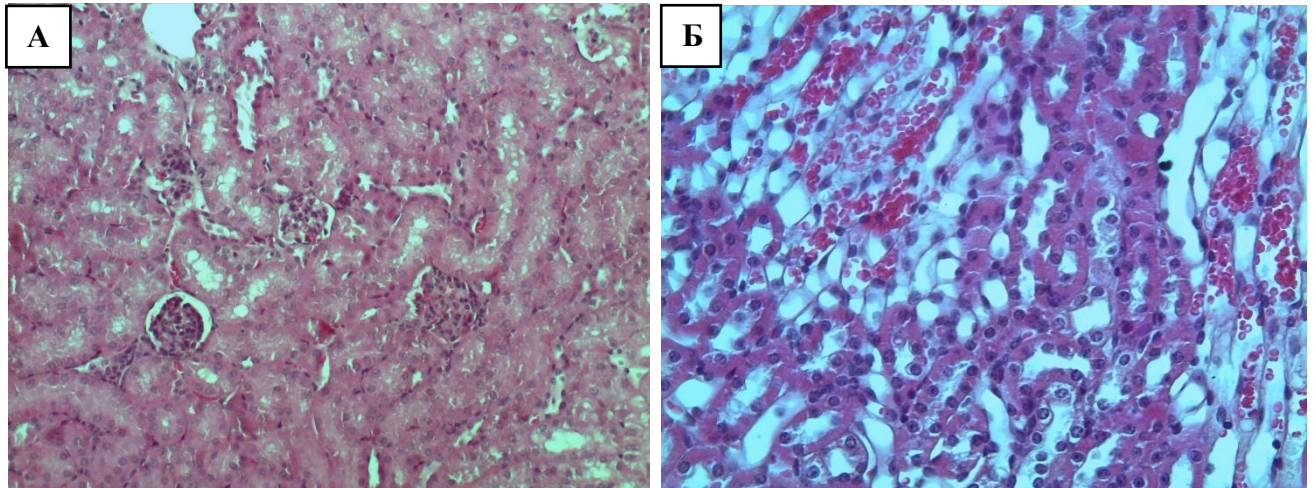


Рисунок 14 – Срезы почки через 15 мин. после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (А), увеличение $\times 100$ и 400 мг/кг (Б), увеличение $\times 200$. Окраска гематоксилином и эозином

В почках мышей через 15 минут после однократного введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг отмечали преимущественно полнокровные сосуды микроциркуляторного русла, в сосудах – образование «монетных столбиков», сладжирование эритроцитов; величина клубочков не изменялась, капилляры клубочков были равномерно кровенаполнены (Рисунок 14 Б). Пространства капсул были расширены (визуализировался более выраженный отёк гломерул, в сравнении с экспериментальной группой ЛК-300 через 15 минут после введения препарата, капсулы свободные. Отмечали высокий, набухший эпителий проксимальных канальцев эозинофильной окраски; просвет канальцев был сужен за счёт отёка, менее выраженного, в сравнении с экспериментальной группой

ЛК-300 через 15 минут после введения препарата. Встречались проксимальные канальцы, в которых цитоплазма местами зернистая или глыбчатая, апикальный край не ровный, а ядра базофильной окраски, не везде четко контурированы.

В почках мышей через 30 минут после однократного введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг, так же, как и в двух вышеописанных группах, нарушение кровообращения в сосудах микроциркуляторного русла было представлено сладжами и стазами в капиллярах, в том числе в капиллярах клубочков (Рисунок 15 А, Б). Характерным оставался отёк гломерул, отёк эпителия проксимальных канальцев. Отличительным признаком являлось повреждение большей части эпителия проксимальных канальцев. Во многих полях зрения цитоплазма эпителия была зернистая или глыбчатая, апикальный край не ровный, ядра базофильные, единичные ядра бледно-базофильные в виде «теней» или не различимы. В отдельных полях зрения встречался частично десквамированный эпителий.

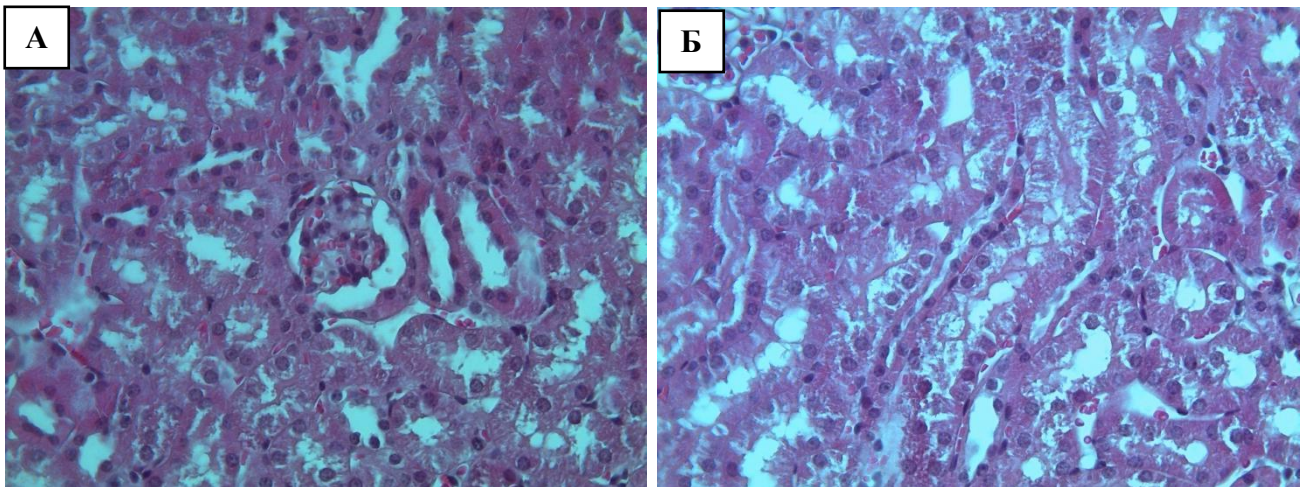


Рисунок 15 – Срезы почки через 30 мин. после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (А) и 400 мг/кг (Б). Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 200$

Сосуды микроциркуляторного русла почек мышей через 90 минут после однократного введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг были

неравномерного кровенаполнения, местами малокровные, встречались «спавшиеся» клубочки (Рисунок 16 А, Б). Эпителий проксимальных канальцев высокий, набухший, преимущественно с зернистой или глыбчатой цитоплазмой, апикальный край не ровный, ядра бледно базофильные или не различимы; многие канальца с частично десквамированным эпителием.

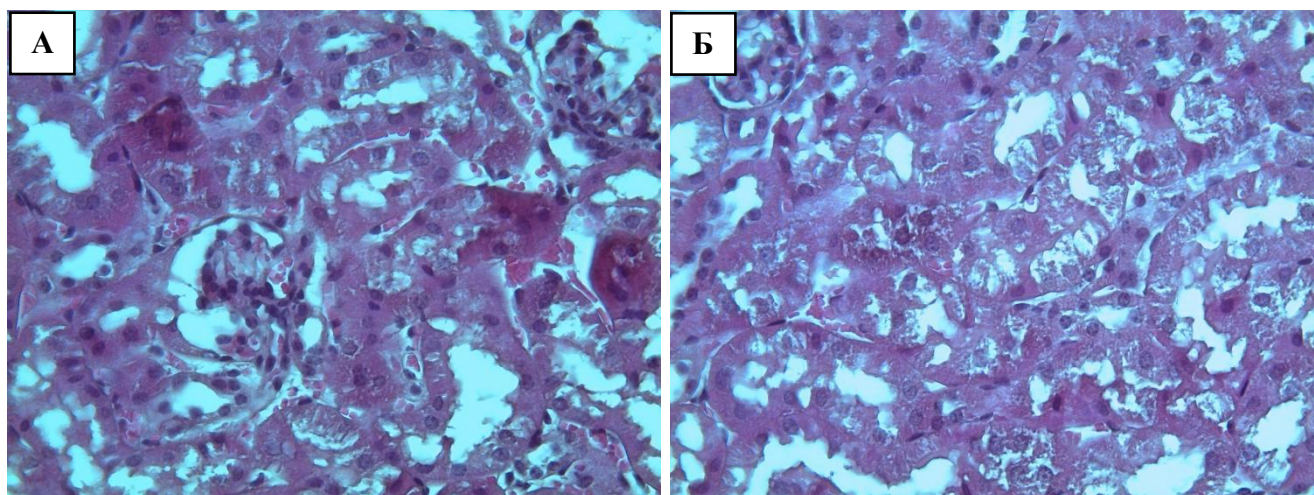


Рисунок 16 – Срезы почки через 90 мин. после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (А) и 400 мг/кг (Б). Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 200$

Морфологическая картина структуры почки у мышей через 180 минут после введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг соответствовала изменениям, выявленным в группах ЛК-300 и ЛК-400 через 90 минут после введения препарата (Рисунок 17 А). Дистрофические изменения нефротелия и ядер были более выражены.

В почках мышей через 180 минут после однократного введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг наблюдали резко выраженное полнокровие корковой зоны и самих клубочков (Рисунок 17 Б). Просвет капсул клубочков не просматривался (резчайший отёк гломерул). Просвет канальцев в некоторых полях зрения был слабо различим или не различим. Так же, как и в группе ЛК-300 через 180 минут после введения препарата, были значительно выражены

дистрофические изменения нефротелия: эпителий с зернистой или глыбчатой цитоплазмой, встречались бледные ядра в виде теней или не различимы.

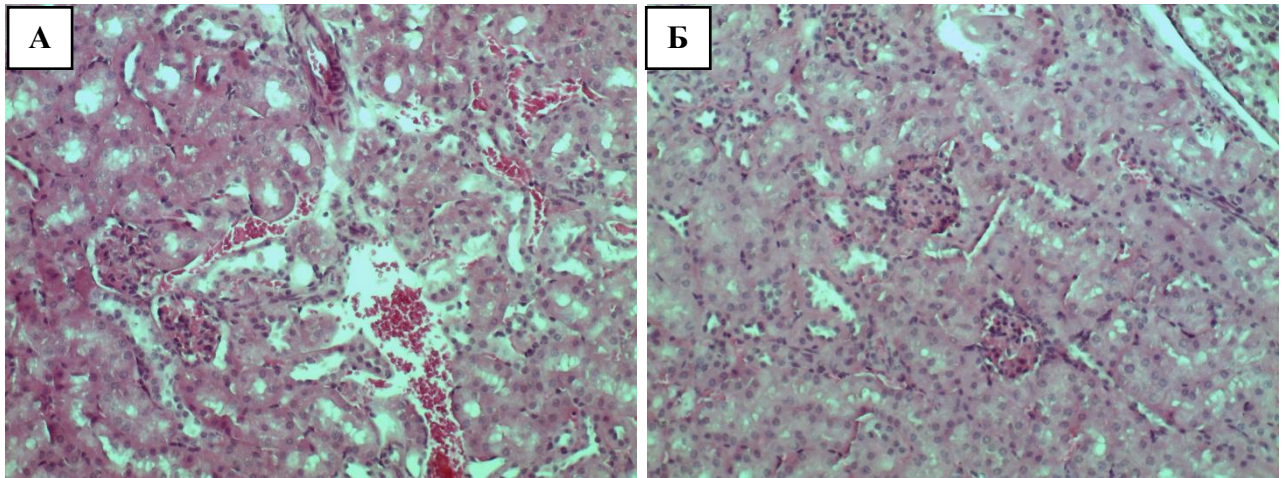


Рисунок 17 – Срезы почки через 180 мин. после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (А) и 400 мг/кг (Б). Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 100$

Через 7 суток после введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг большая часть эпителия проксимальных канальцев почек экспериментальных животных имела обычное гистологическое строение с хорошо конструированными, базофильными ядрами, просвет канальцев был различим (Рисунок 18).

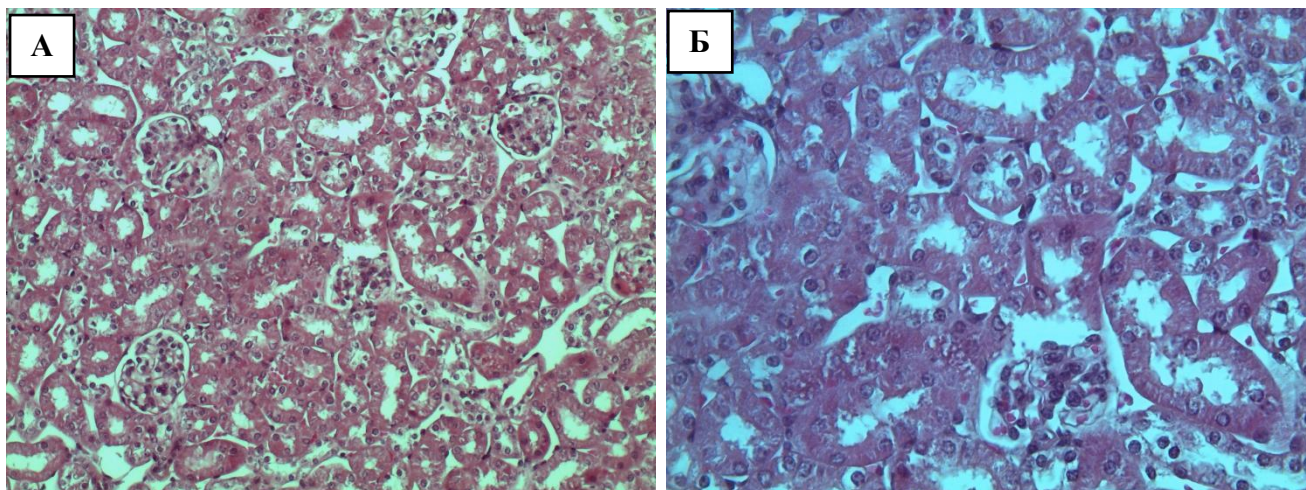


Рисунок 18 – Срезы почки через 7 суток после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (А) увеличение $\times 100$ и 400 мг/кг (Б), увеличение $\times 200$.

Окраска гематоксилином и эозином

Таким образом, морфологические изменения структуры почки визуализировались уже через 15 минут после введения лития карбоната. Они были представлены нарушением кровообращения в сосудах микроциркуляторного русла, формированием отёка клубочков и эпителия проксимальных канальцев. Кроме того, в исследуемой группе «15 минут 400 мг/кг», встречались участки с поврежденным эпителием проксимальных канальцев. В исследуемых группах «30 минут 300 мг/кг» и «30 минут 400 мг/кг» отмечали прогрессирующее повреждение эпителия проксимальных канальцев с частичной его десквамацией. Наиболее выраженные альтеративные изменения эпителия проксимальных канальцев были представлены в исследуемых группах через 90 и 180 минут после введения лития карбоната в дозах 300 и 400 мг/кг. Через 7 суток после введения лития карбоната в двух исследуемых дозах 300 и 400 мг/кг наблюдали восстановление эпителия проксимальных канальцев.

3.2.4 Анализ повреждения почек при введении лития карбоната с учетом данных ШИК-реакции

Анализ площади положительно окрашенных почечных канальцев периодической кислотой Шиффа (ШИК-реакция) был выполнен для оценки острого повреждения почек (Рисунок 19).

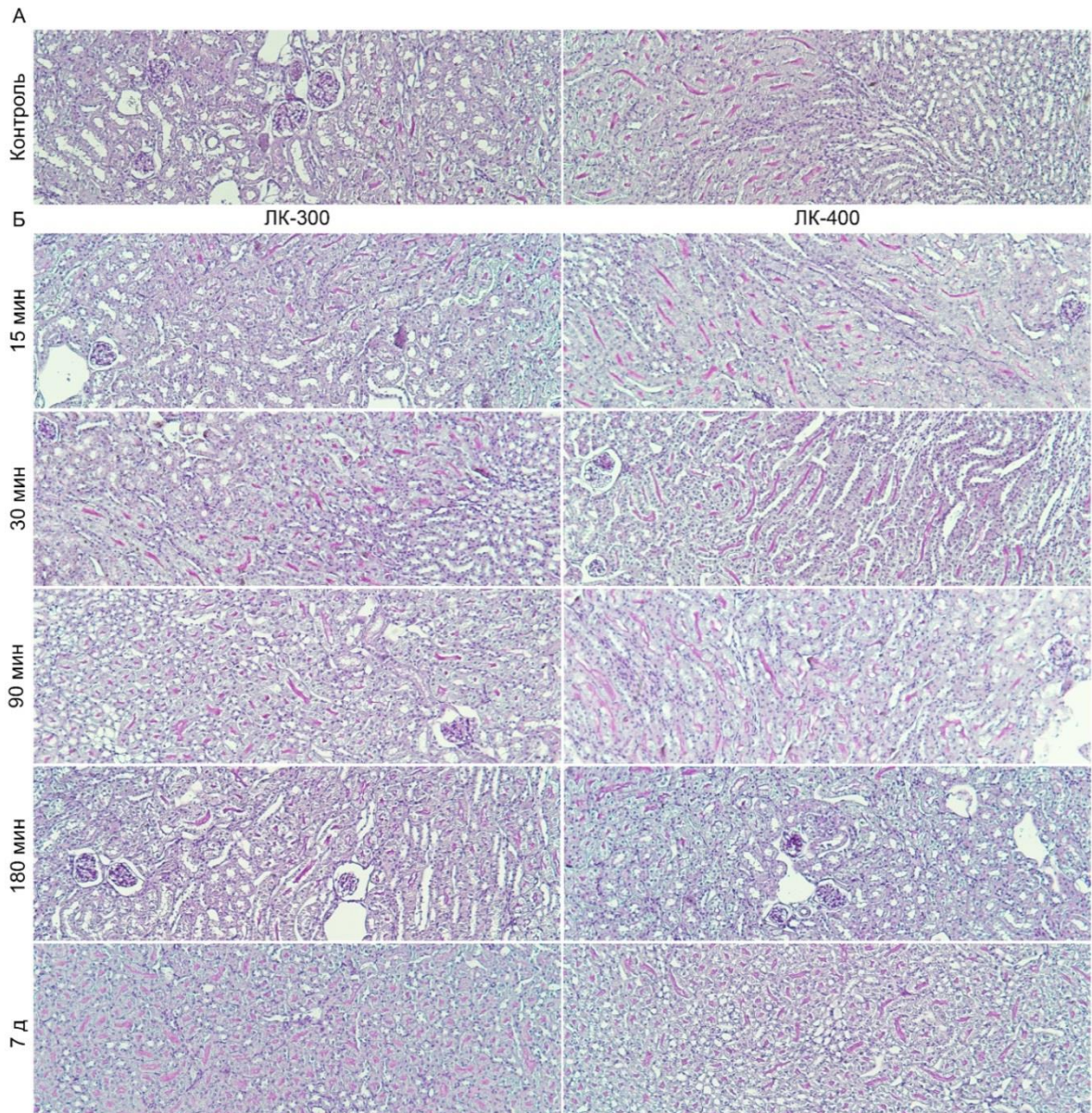


Рисунок 19 – Микропрепараты ткани почки контрольной группы (А), и через 15 мин., 30 мин., 90 мин., 180 мин. и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) и 400 мг/кг (ЛК-400) (Б) мышам с В16 меланомой. ШИК-реакция. Увеличение $\times 100$

Введение лития карбоната в дозах 300 мг/кг и 400 мг/кг не приводило к значительному изменению структуры почечных канальцев в сравнении с контрольной группой. В опытных группах через 7 суток после введения препарата площадь окрашивания почечных канальцев соответствовала значениям в контрольной группе, что свидетельствует об отсутствии острого повреждения почек (таблица 3).

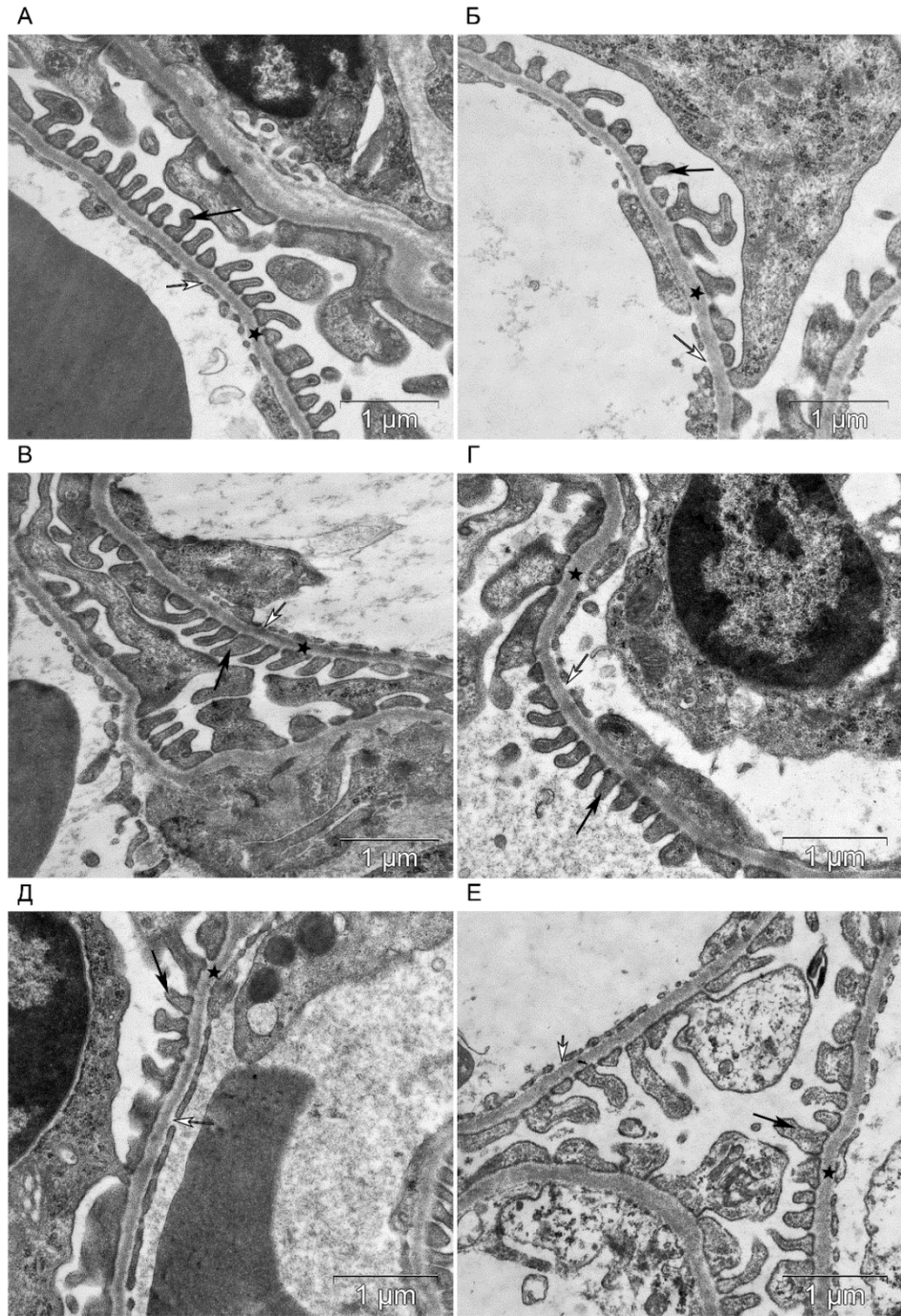
Таблица 3 – Оценка площади окрашивания гликогена (%) почечных канальцев периодической кислотой Шиффа (ШИК-реакция) в контрольной группе и у мышей через 15 мин., 30 мин., 90 мин., 180 мин. и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) и 400 мг/кг (ЛК-400)

Группа	% площади окрашивания почечных канальцев	
Контроль	4,16 ± 0,11	
Время после введения ЛК	ЛК-300	ЛК-400
15 мин.	4,81 ± 0,31	3,83 ± 0,22
30 мин.	4,49 ± 0,16	4,97 ± 0,17
90 мин.	3,52 ± 0,51	4,60 ± 0,33
180 мин.	3,38 ± 0,59	3,16 ± 0,36
7 сут	5,09 ± 1,29	3,91 ± 0,09
Примечание – данные представлены как (M ± SD) (n = 5)		

3.2.5 Ультраструктурная организация фильтрационного барьера и проксимального отдела почки

Однократное пероральное введение лития карбоната в дозах 300 мг/кг и 400 мг/кг не приводило к значимому изменению ультраструктурной организации компонентов фильтрационного барьера почки мышей с В16 меланомой через 15 минут, 30 минут, 90 минут, 180 минут и 7 суток (Рисунок 20). Достоверных различий между контрольной группой и опытными группами, получавшими лития карбонат среди исследуемых параметров, таких как толщина

гломерулярной базальной мембраны и базальной мембраны эпителиоцитов проксимальных канальцев, ширина и количество ножек подоцитов, количество и выраженность фенестр эндотелиоцитов гломерулярных капилляров, ширина щелевой диафрагмы выявлено не было. Также не было обнаружено статистически значимых различий между опытными группами, получавшими лития карбонат в дозах 300 мг/кг и 400 мг/кг среди всех исследуемых параметров.



Примечание – Гломерулярная базальная мембрана (*звездочки*); ножки подоцитов (*черные стрелки*); фенестры эндотелиоцитов гломерулярных капилляров (*белые стрелки*)

Рисунок 20 – Электронно-микроскопическое исследование почки. Ультраструктура почечного фильтра в контрольной группе (А), и после введения лития карбоната через 15 мин., доза 300 мг/кг (Б), 30 мин., доза 400 мг/кг (В), 90 мин., доза 300 мг/кг (Г), 180 мин., доза 300 мг/кг (Д) и 7 суток, доза 400 мг/кг (Е)

Для оценки структуры эпителия проксимальных канальцев почки мышей после введения лития карбоната было выполнено электронно-микроскопическое исследование апикальной, околоядерной и базальной зон эпителиоцитов во всех исследуемых группах. В контрольной группе животных с опухолевым ростом отмечали локальные участки набухания цитоплазмы эпителиоцитов (Рисунок 21 А). При анализе апикальной зоны клеток также было выявлено небольшое набухание цитоплазмы и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев в группе животных с опухолевым ростом (Рисунок 21 Б). Структурные признаки набухания цитоплазмы были выявлены и в околоядерной зоне клеток проксимальных канальцев. Наблюдалось расширение цистерн комплекса Гольджи и наличие вакуолей в цитоплазме (Рисунок 21 В). В базальной части клеток отмечали нарушение структуры митохондрий (Рисунок 21 Г).

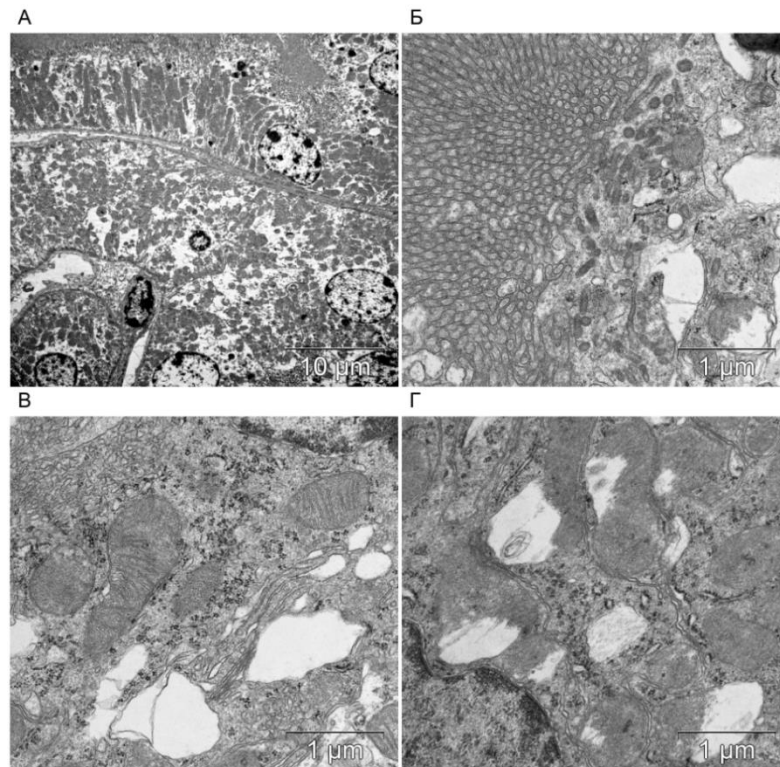


Рисунок 21 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев в контрольной группе мышей с отдаленным опухолевым ростом. Наличие отека цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных канальцев (А). Набухание апикальной зоны эпителиоцита и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев (Б). Расширение цистерн комплекса Гольджи и наличие вакуолей в цитоплазме (В). Нарушение структуры митохондрий (Г)

При электронно-микроскопическом исследовании эпителиоцитов проксимальных канальцев почки мышей через 15 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг отмечали наличие отека-набухания цитоплазмы эпителиоцитов (Рисунок 22). При анализе апикальной зоны клеток было выявлено набухание цитоплазмы и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев (Рисунок 22 Б). Структурные признаки набухания цитоплазмы были выявлены и в околоядерной зоне клеток проксимальных канальцев. Кристы митохондрий были слабо выражены, в цитоплазме отмечали наличие вакуолей (Рисунок 22 В). Набухание цитоплазмы отмечали и в базальной части клеток (Рисунок 22 Г).

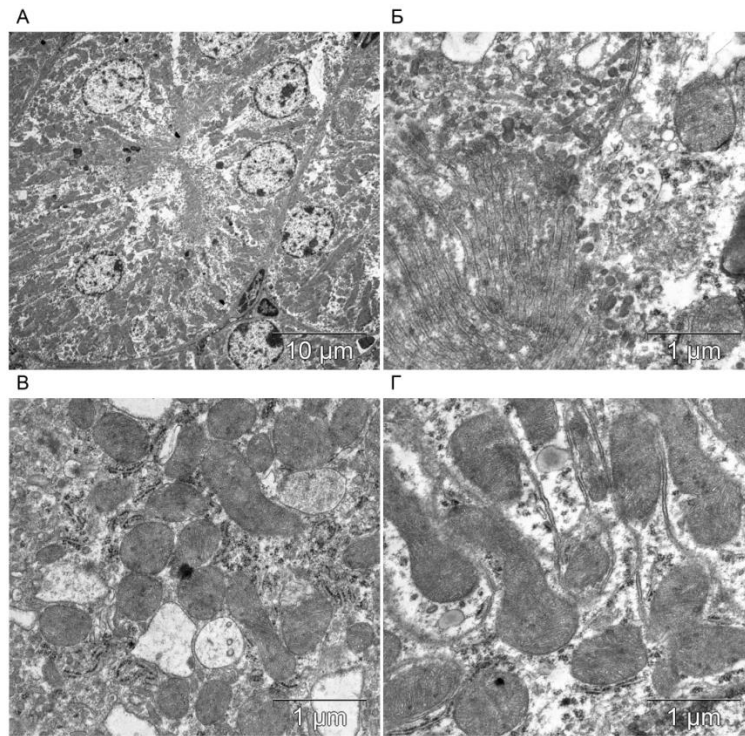


Рисунок 22 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 15 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг. Наличие отека цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных канальцев (А). Набухание апикальной зоны эпителиоцита и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев (Б). Митохондрии с со слабо выраженными кристами, наличие вакуолей в околядерной зоне цитоплазме (В). Набухание цитоплазмы в базальной части эпителиоцита (Г)

При исследовании эпителиоцитов проксимальных канальцев почки мышей через 15 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг отмечали гетерогенность структуры эпителиоционов в пределах канальца – набухание одних эпителиоцитов и уплотнение структуры других клеток (Рисунок 23). При анализе апикальной зоны клеток было выявлено набухание цитоплазмы и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев в группе животных с опухолевым ростом (Рисунок 23 Б). Структурные признаки дезорганизации цитоплазмы в виде накопления электронно-плотного

материала выявлены в околоядерной зоне части клеток проксимальных канальцев (Рисунок 23 В). В базальной части клеток, в результате набухания цитоплазмы не четко выявлялась базальная исчерченность эпителиоцитов проксимального канальца (Рисунок 23 Г).

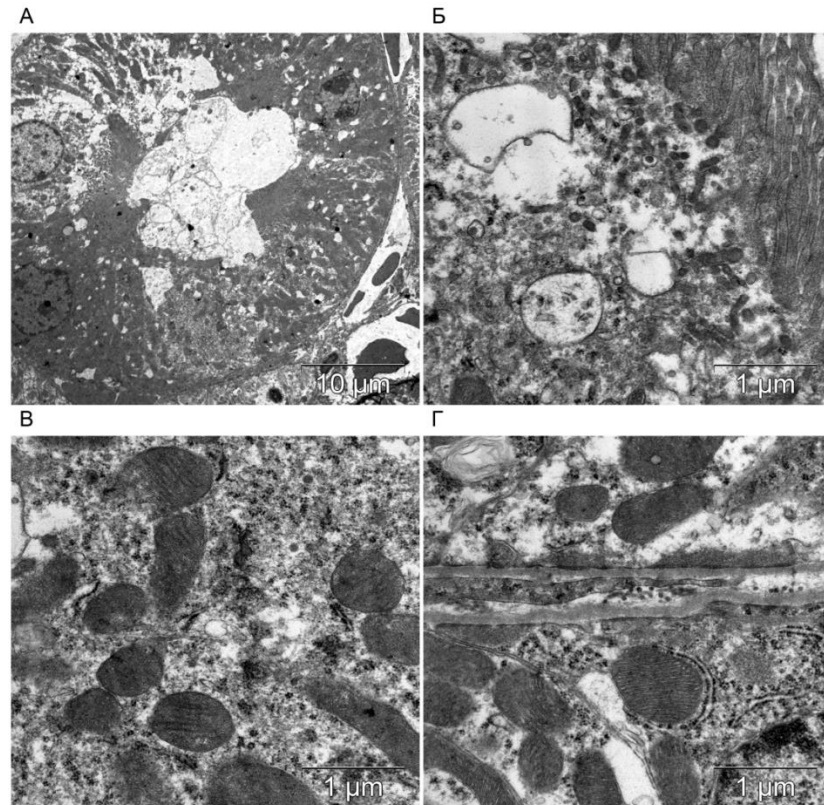


Рисунок 23 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 15 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг. Наличие отека цитоплазмы части эпителиоционов и присутствие клеток с электронно-плотной цитоплазмой в пределах проксимального канальца (А). Набухание апикальной зоны эпителиоцита и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев (Б). Накопление электронно-плотного материала в околоядерной зоне цитоплазмы (В). Слабо выраженная базальная исчерченность и набухание цитоплазмы (Г)

При электронно-микроскопическом исследовании эпителиоцитов проксимальных канальцев почки мышей через 30 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг также отмечали набухание эпителиоцитов (Рисунок 24). При анализе апикальной зоны клеток было выявлено набухание цитоплазмы и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев (Рисунок 24 Б). Структурные признаки набухания цитоплазмы и наличие аутофагосом были выявлены в околоядерной зоне клеток проксимальных канальцев. Отмечали снижение содержания мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума и наличие электронно-плотного материала в цитоплазме эпителиоцитов (Рисунок 24 В). В базальной части клеток также выявлялось набухание цитоплазмы (Рисунок 24 Г).

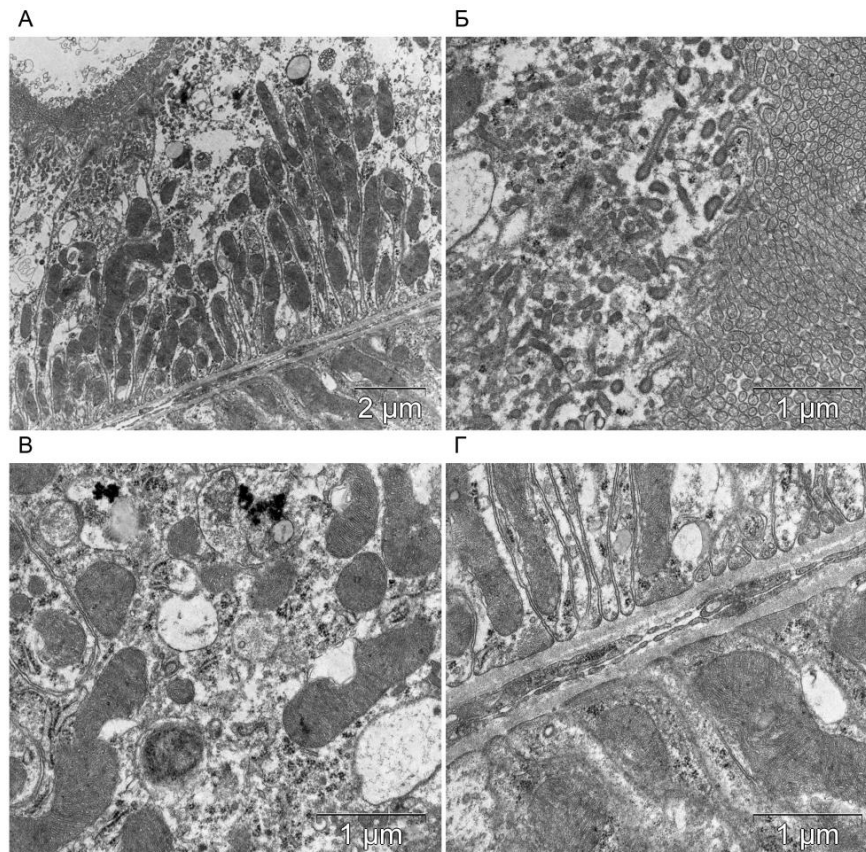


Рисунок 24 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 30 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг. Наличие отека цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных канальцев, доза 300 мг/кг (А). Набухание апикальной зоны эпителиоцита и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев, доза 400 мг/кг (Б). Наличие аутофагосом, снижение содержания мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, накопление электронно-плотного материала в цитоплазме, доза 300 мг/кг (В). Набухание цитоплазмы в базальной части эпителиоцита, доза 400 мг/кг (Г)

Через 90 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг в почках мышей сохранялось набухание эпителиоцитов (Рисунок 25). Апикальная зона клеток характеризовалась более низким содержанием эндосом и плотных апикальных канальцев, в сравнении с группами «30 минут, 300 и 400 мг/кг» (Рисунок 25 Б). Структурные признаки набухания

цитоплазмы были выявлены и в околоядерной зоне клеток проксимальных канальцев. Кристы митохондрий были слабо выражены, отмечали снижение содержания мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума и полисом (Рисунок 25 В). В базальной части клеток, в результате набухания цитоплазмы не четко выявлялась базальная исчерченность эпителиоцитов проксимального канальца (Рисунок 25 Г).

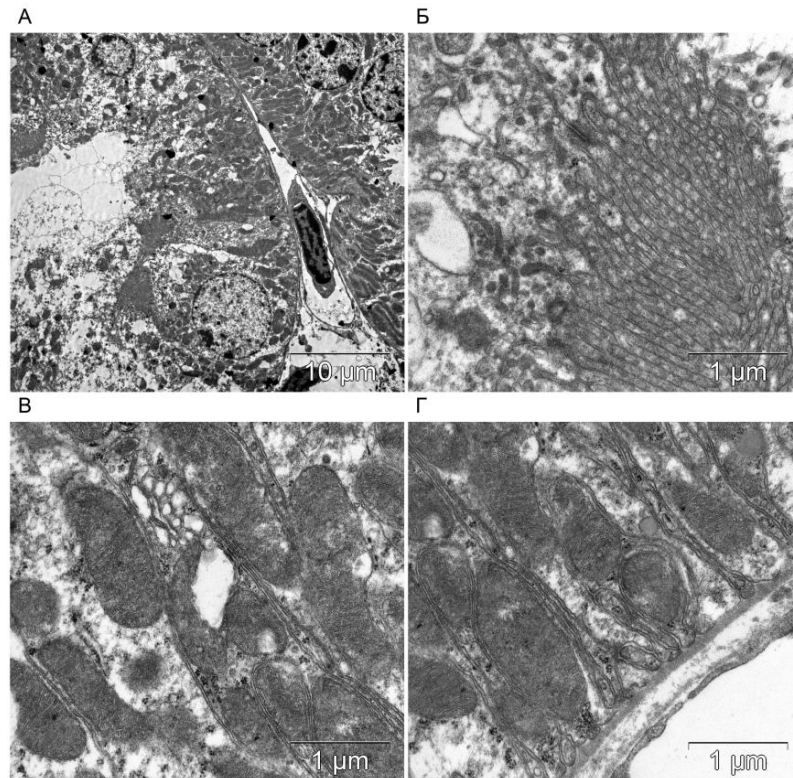


Рисунок 25 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 90 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг. Наличие отека цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных канальцев, доза 300 мг/кг (А). Значительное снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев, доза 400 мг/кг (Б). Митохондрии со слабо выраженными кристами, снижение содержания мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума и полисом в цитоплазме, доза 300 мг/кг (В). Слабо выраженная базальная исчерченность в цитоплазме эпителиоцита, доза 400 мг/кг (Г)

Через 180 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг отмечали те же изменения, что и в двух описанных выше группах (Рисунок 26). Сохранялись набухание цитоплазмы и низкое содержание эндосом и плотных апикальных канальцев (Рисунок 26 Б). В группе «180 минут, 400 мг/кг» отличительной особенностью являлось наличие единичных зон деструкции в отдельных эпителиоцитах (Рисунок 26 В, Г). Базальная исчерченность эпителиоцитов была также значительно снижена (Рисунок 26 Г).

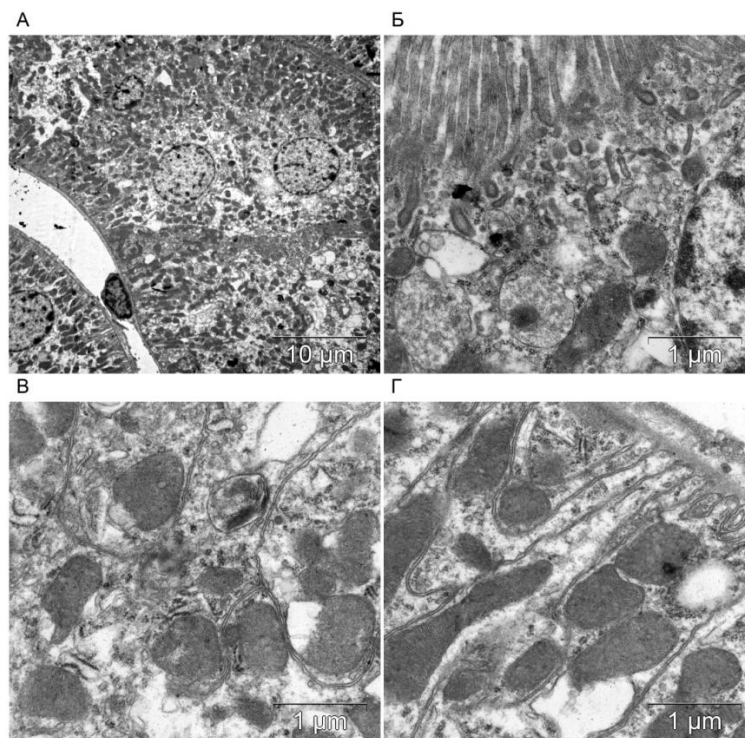


Рисунок 26 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 180 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг. Наличие отека цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных канальцев, доза 300 мг/кг (А). Низкое содержание эндосом и плотных апикальных канальцев, доза 300 мг/кг (Б). Митохондрии со слабо выраженными кристами, наличие зон деструкции в цитоплазме, доза 400 мг/кг (В). Слабо выраженная базальная исчерченность и наличие зон деструкции цитоплазмы, доза 400 мг/кг (Г)

Ультраструктура эпителиоцитов проксимальных канальцев почки мышей через 7 суток в двух группах – после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг и 400 мг/кг была схожей; сохранялись зоны набухания цитоплазмы отдельных эпителиоцитов (Рисунок 27). Содержание эндосом и плотных апикальных канальцев в апикальной зоне эпителиоцитов соответствовало их количеству в контрольной группе (Рисунок 27 Б). Структурные признаки набухания цитоплазмы были выявлены и в околоядерной зоне отдельных клеток проксимальных канальцев. Кристы митохондрий были слабо выражены, содержания мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума и полисом также соответствовало значениям в контрольной группе (Рисунок 27 В). В базальной части клеток, в результате набухания цитоплазмы не четко выявлялась базальная исчерченность эпителиоцитов проксимального канальца (Рисунок 27 Г).

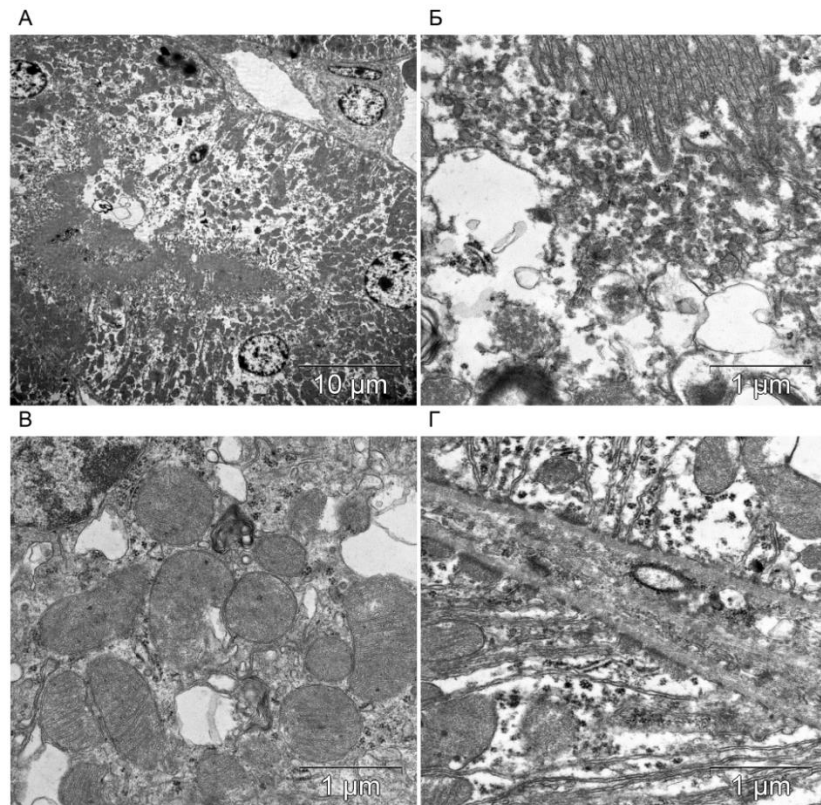


Рисунок 27 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 7 суток после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг и 400 мг/кг. Наличие отека-набухания цитоплазмы отдельных эпителиоцитов проксимальных канальцев, доза 300 мг/кг (А). Набухание апикальной зоны эпителиоцита проксимального канальца, доза 400 мг/кг (Б). Митохондрии со слабо выраженными кристами, доза 300 мг/кг (В).

Уменьшение базальной исчерченности в цитоплазме эпителиоцита проксимального канальца, доза 400 мг/кг (Г)

Для анализа выраженности изменений эпителия проксимальных канальцев была проведена морфометрия толщины базальной мембраны эпителиоцитов проксимальных канальцев (Рисунок 28).

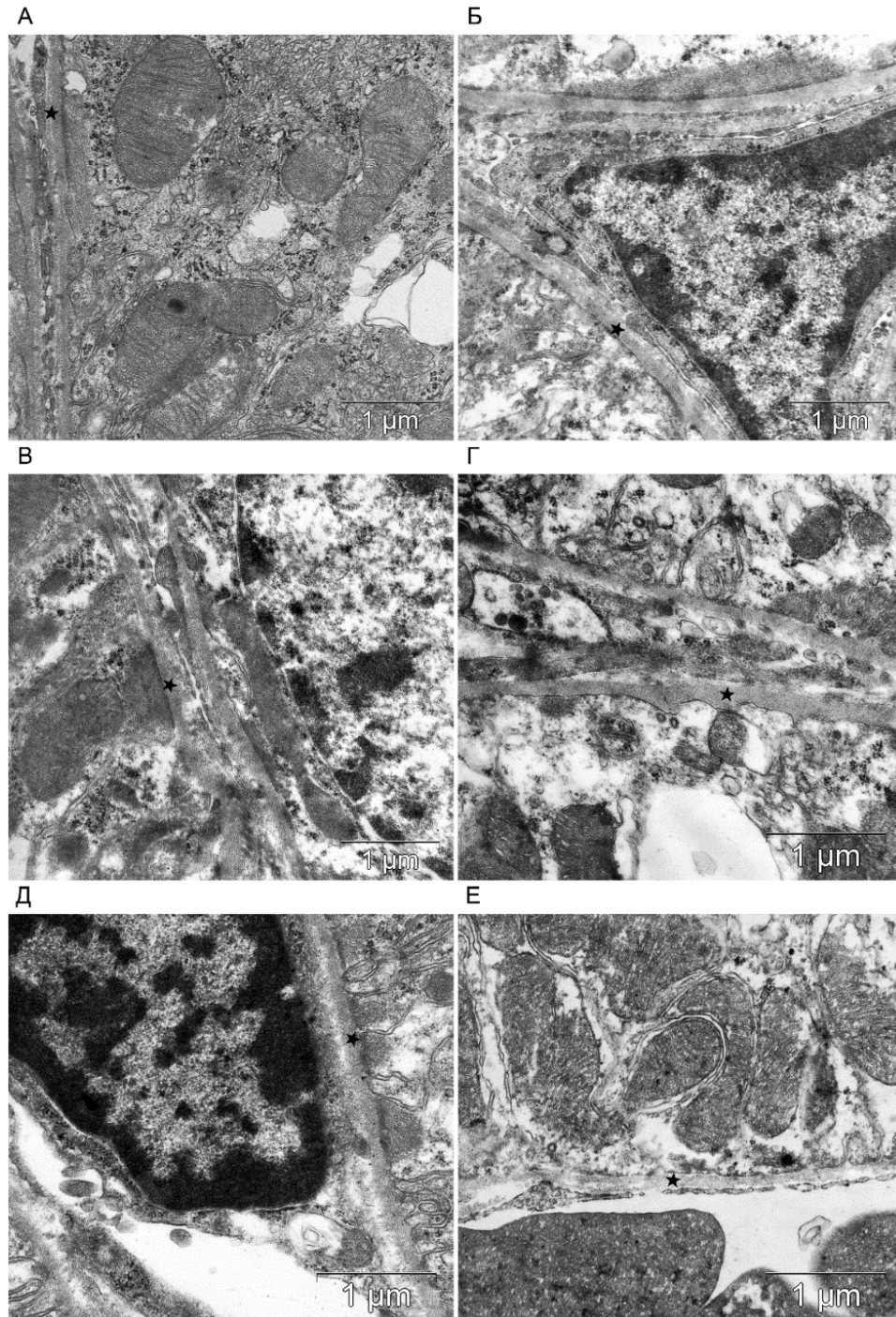


Рисунок 28 – Электронно-микроскопическое исследование почки. Ультраструктура эпителиоцитов проксимальных канальцев в контрольной группе (А) и после введения лития карбоната: через 15 мин., доза 300 мг/кг (Б), 30 мин., доза 400 мг/кг (В), 90 мин., доза 300 мг/кг (Г), 180 мин., доза 300 мг/кг (Д) и 7 суток, доза 400 мг/кг (Е). Базальные мембраны эпителиоцитов проксимальных канальцев (звездочки)

При сравнении контрольной группы мышей с опухолевым ростом и экспериментальных групп мышей, получавших лития карбонат, достоверных различий по данному параметру выявлено не было (таблица 4, 5).

Таблица 4 – Результаты морфометрии компонентов фильтрационного барьера и эпителиоцитов проксимальных канальцев почки в контрольной группе и через 15 мин., 30 мин., 90 мин., 180 мин. и 7 суток после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг

Параметры	Контроль	Время после введения ЛК				
		15 мин.	30 мин.	90 мин.	180 мин.	7 сут
Гломерулярная базальная мембрана, толщина (мкм)	57,1 ± 6,9	53,2 ± 3,5	59,0 ± 4,4	71,8 ± 11,5	60,9 ± 10,4	56,1 ± 5,7
09Ножки подоцитов, ширина (мкм)	142,1 ± 101,7	135,1 ± 63,4	151,0 ± 75,0	152,3 ± 125,7	153,5 ± 115,8	122,8 ± 62,6
Ножки подоцитов, количество (2 мкм ГМ)	6 ± 2	5,0 ± 1,6	5,8 ± 1,1	5,6 ± 2,7	5,4 ± 0,8	6,6 ± 2,0
Базальная мембрана эпителиоцитов проксимальных канальцев, толщина (мкм)	67,9 ± 14,0	62,8 ± 9,1	62,6 ± 4,0	65,6 ± 12,7	65,7 ± 11,1	60,3 ± 8,8
Фенестры эндотелиоцитов гломерулярных капилляров, количество (2 мкм ГМ)	3,6 ± 1,7	3,8 ± 0,8	4,4 ± 1,5	4,2 ± 1,7	3,2 ± 1,3	4,8 ± 1,3

Параметры	Контроль	Время после введения ЛК				
		15 мин.	30 мин.	90 мин.	180 мин.	7 сут
Щелевая диафрагма, ширина (мкм)	15,6 ± 4,4	15,7 ± 3,1	14,0 ± 3,4	15,5 ± 5,2	14,6 ± 3,9	16,0 ± 3,2
Примечание – данные представлены как (M ± SD) (n = 5).						

Таблица 5 – Результаты морфометрии компонентов фильтрационного барьера и эпителиоцитов проксимальных канальцев почки в контрольной группе и через 15 мин., 30 мин., 90 мин., 180 мин. и 7 суток после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг

Параметры	Контроль	Время после введения ЛК				
		15 мин.	30 мин.	90 мин.	180 мин.	7 сут.
Гломерулярная базальная мембрана, толщина (мкм)	57,1 ± 6,9	61,2 ± 3,0	55,6 ± 7,9	62,4 ± 12,2	63,6 ± 8,3	62,7 ± 7,8
Ножки подоцитов, ширина (мкм)	142,1 ± 101,7	121,5 ± 67,5	112,0 ± 55,2	134,6 ± 110,7	189,6 ± 213,5	106,0 ± 43,2
Ножки подоцитов, количество (2 мкм ГМ)	6 ± 2	7,0 ± 0,8	6,5 ± 1,3	6,4 ± 1,94	5,4 ± 2,1	7 ± 1,5
Базальная мембрана эпителиоцитов проксимальных канальцев, ширина (мкм)	67,9 ± 14,0	62,1 ± 4,0	59,0 ± 6,0	66,8 ± 8,1	60,3 ± 10,4	65,6 ± 5,9
Фенестры эндотелиоцитов	3,6 ± 1,7	3,8 ± 1,1	4,3 ± 0,5	3,4 ± 1,6	3,4 ± 1,5	5 ± 1

Параметры	Контроль	Время после введения ЛК				
		15 мин.	30 мин.	90 мин.	180 мин.	7 сут.
гломерулярных капилляров, количество (2 мкм ГМ)						
Щелевая диафрагма, ширина (мкм)	15,6 ± 4,4	12,2 ± 2,6	14,0 ± 5,1	14 ± 3,4	13,1 ± 3,1	16,1 ± 4,4
Примечание – данные представлены как (M ± SD) (n = 5).						

3.2.6 Оценка экспрессии белков-маркеров острого повреждения почек Kim-1 и NGAL

Для оценки острого повреждения почек после введения высоких доз лития карбоната использовали маркеры Kim-1 (Kidney injury molecule 1) и NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin). Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов почки в контрольной группе и через 15, 30, 90, 180 минут и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг и 400 мг/кг на маркер представлены на рисунке 29. Достоверных отличий в уровнях экспрессии белка Kim-1 при введении лития карбоната в дозе 300 мг/кг по сравнению с контрольной группой выявлено не было (Рисунок 30). Однако отмечалось его повышение в 1,7 раз через 30 минут после введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг (Рисунок 30). На более поздних временных точках эксперимента уровни экспрессии Kim-1 соответствовали показателям в контрольной группе.

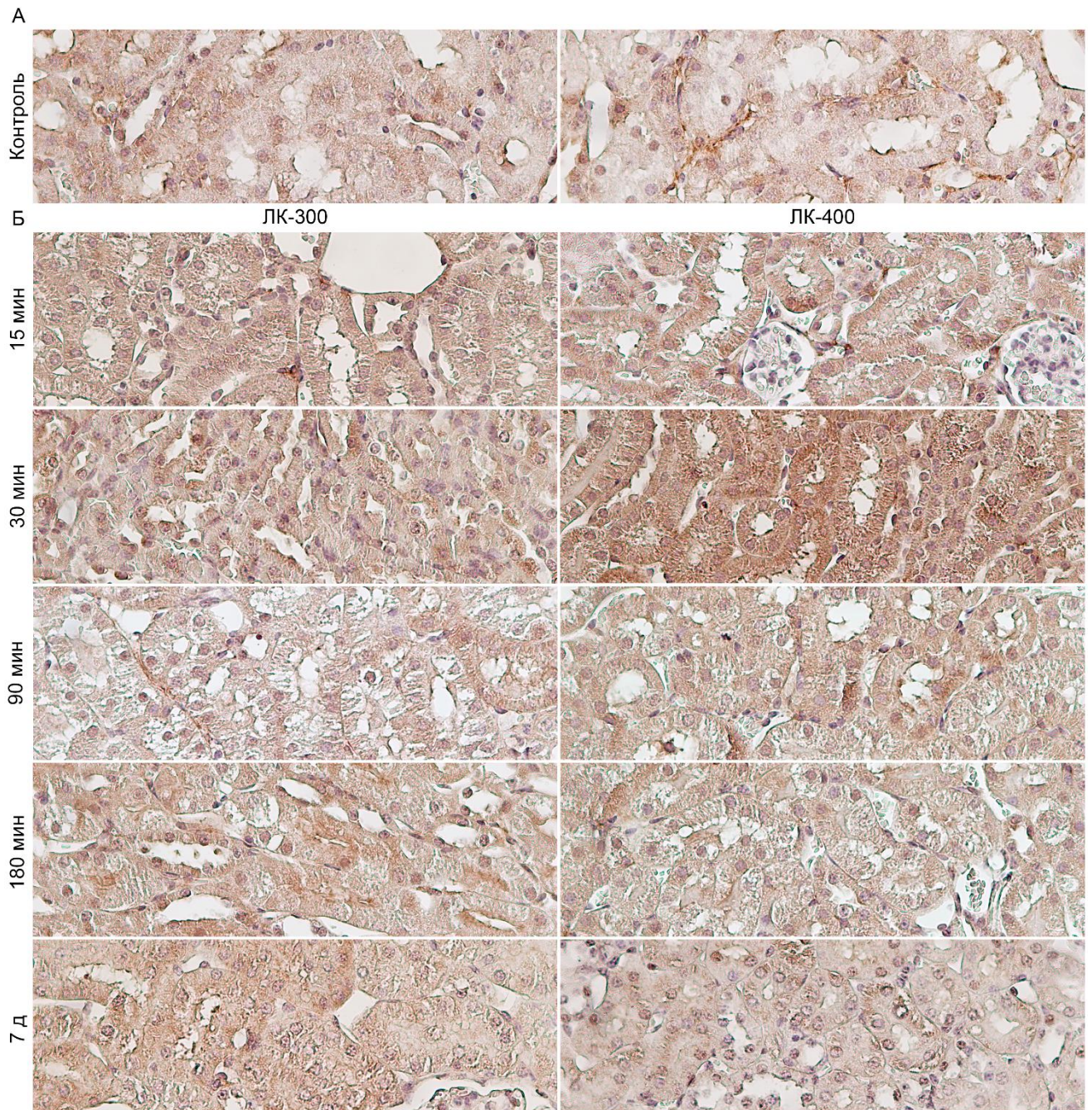
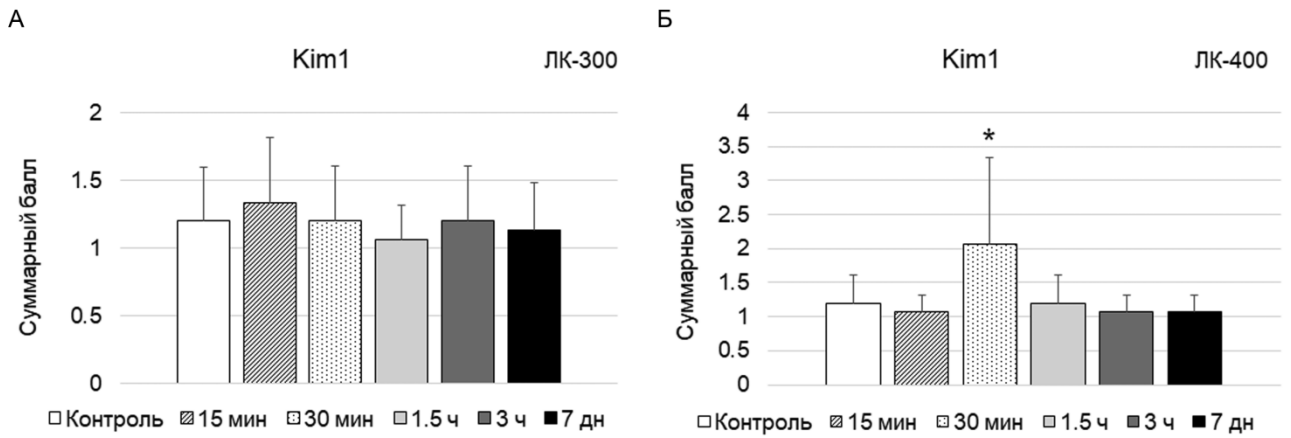


Рисунок 29 – Иммуногистохимическое окрашивание срезов почки на маркер острого повреждения почек Kim-1. Контрольная группа (А), через 15, 30, 90, 180 минут и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) и 400 мг/кг (ЛК-400) (Б). Увеличение $\times 400$



Примечание – данные представлены как ($M \pm SD$); * – ($p < 0,05$) – по сравнению с контрольной группой

Рисунок 30 – Оценка результатов иммуногистохимического окрашивания срезов почки на маркер острого повреждения почек Kim-1 в контрольной группе и через 15, 30, 90, 180 минут и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300, А) и 400 мг/кг (ЛК-400, Б)

Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов почки в контрольной группе и через 15, 30, 90, 180 минут и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг и 400 мг/кг на маркер NGAL представлены на рисунке 31. При определении уровней экспрессии данного белка при введении лития карбоната в дозе 300 мг/кг по сравнению с контрольной группой достоверных отличий выявлено не было (Рисунок 32), при этом уровни NGAL повышались в 3 раза через 30 минут и сохранялись повышенными в 1,4 раза через 90 минут после введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг (Рисунок 32). На более поздних временных точках эксперимента (180 минут и 7 дней) уровни экспрессии NGAL соответствовали показателям в контрольной группе.

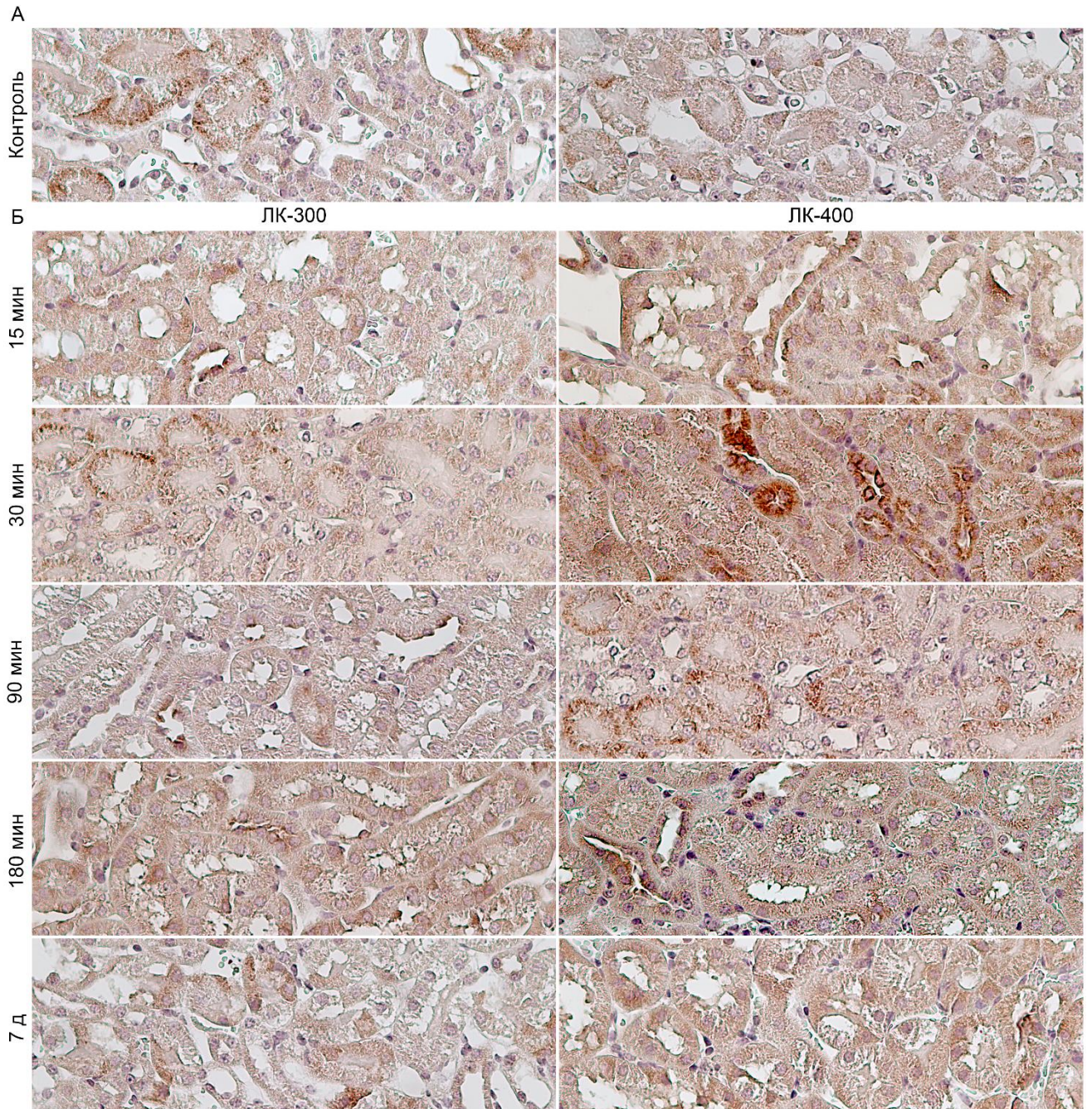
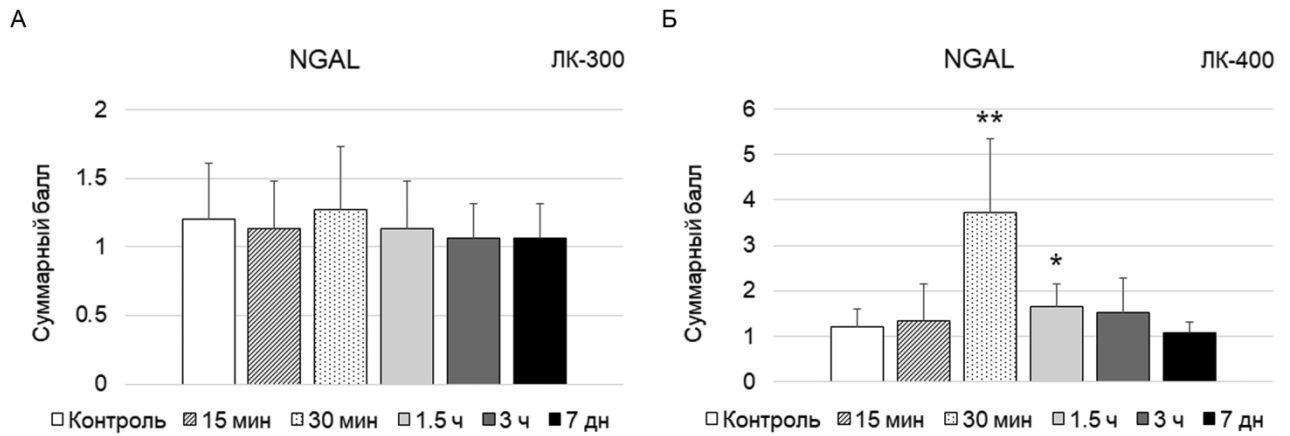


Рисунок 31 – Иммуногистохимическое окрашивание срезов почки на маркер острого повреждения почек NGAL. Контрольная группа (А), через 15, 30, 90, 180 минут и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) и 400 мг/кг (ЛК-400) (Б). Увеличение 10×40



Примечание – данные представлены как ($M \pm SD$); * – ($p < 0,05$), ** – ($p < 0,0005$) – по сравнению с контрольной группой

Рисунок 32 – Оценка результатов иммуногистохимического окрашивания срезов почки на маркер острого повреждения почек NGAL в контрольной группе и через 15, 30, 90, 180 минут и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300, А) и 400 мг/кг (ЛК-400, Б)

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1 Сравнительная оценка цитотоксичности и накопления бора и лития *in vitro*

Бор-нейтронозахватная терапия является перспективной и активно развивающейся методикой лучевой терапии, направленной на избирательное повреждение и уничтожение опухолевых клеток с минимальным повреждением окружающих здоровых тканей [25; 70; 74; 75; 86; 261]. Внедрение новых методов лечения пациентов с онкологическими заболеваниями будет способствовать увеличению продолжительности жизни и времени безрецидивного периода, а также повышению качества жизни таких пациентов.

${}^6\text{Li}$ может стать альтернативным изотопом вместо ${}^{10}\text{B}$ для проведения нейтронозахватной терапии, поскольку имеет достаточно большое сечение поглощения нейтрона. Для проверки данной гипотезы, в первую очередь необходимо определить потенциальную токсичность лития в концентрации, эффективной для нейтронозахватной реакции, и оценить накопление лития в опухолевых клетках.

Полученные результаты показали, что три различные соли лития в концентрации лития 40 мкг/мл не токсичны как для нормальных, так и для опухолевых клеток. Достоверное снижение выживаемости в опытных группах по сравнению с контрольными было отмечено при инкубации с солями лития в концентрации лития 160 мкг/мл и более. Таким образом, полученные данные демонстрируют возможность использования всех трех солей лития в концентрациях, минимально требуемых для успешной НЗТ.

Поскольку накопление бора в опухоли является одним из важнейших условий для БНЗТ, в данной работе была проведена оценка накопления лития в нормальных и опухолевых клетках. Помимо того, что литий используется в настоящее время в терапии биполярных расстройств, литий также исследуется как препарат для экспериментальной терапии в онкологии. Было показано, что литий

обладает противоопухолевыми эффектами на различных моделях рака *in vitro* и *in vivo* [174; 178], однако данные о способности лития накапливаться в опухоли ограничены единичными исследованиями [135; 183; 242].

В работе Luessenhop и соавт. был поднят вопрос безопасности применения солей лития у пациентов со злокачественными новообразованиями головного мозга для потенциального применения в НЗТ – оценивалась возможность системного пути введения, достижение концентрации лития в головном мозге и опухоли относительно значений, обнаруженных в плазме крови. Было описано, что при введении 5000 мг лития хлорида пациентам с глиобластомой в течение одного часа, уровень лития сохранялся на приемлемом уровне в течение 3–4 часов, а соотношение между опухолью и нормальной тканью было значительно выше, чем для борфенилаланина [183].

В другом исследовании по накоплению лития выяснилось, что концентрация лития в клетках глиомы крысы (С6) превышает таковую в клетках нейробластомы, кроме того, количество внутриклеточного лития в клетках глиомы крыс обратно пропорционально внеклеточной концентрации калия. Скорость поступления лития в клетки глиомы крысы была постоянной в течение нескольких дней, в отличие от клеток нейробластомы, в которых стабильные уровни достигались в течение одного часа [135].

В исследовании Saneto и соавт. накопления лития клеточными культурами было выявлено, что клетки глиомы накапливали значительно больше лития за тот же период времени, чем клетки нейробластомы, что может говорить о большей скорости поглощения лития [242].

Клинические испытания БНЗТ начинались с использования борной кислоты и ее солей в качестве агента доставки бора [201], в 1968 г. были показаны результаты БНЗТ группой Н. Hatanaka и др. с использованием препарата доставки бора 2 поколения – боркаптата [140; 141], а в 1987 г. группой Y. Mishima и др. с использованием борфенилаланина [248]. Несмотря на активное развитие химии борсодержащих соединений с повышенной селективностью к опухолевым клеткам, боркаптат и борфенилаланин до сих пор продолжают использоваться в

клинических испытаниях БНЗТ, хотя эти препараты в полной мере не отвечают требованиям, предъявляемым к борсодержащим агентам для БНЗТ [38; 78; 227].

При применении борфенилаланина в дозе 40 мкг/мл через 24 часа было выявлено, что концентрации бора в клетках глиомы варьировали в диапазоне от 0,8 до 1 мкг/10⁷ клеток [106]. При исследовании накопления бора тремя клеточными линиями меланомы через 24 часа после инкубации с борфенилаланином в дозе 50 мкг/мл концентрации бора составляли от 0,04 до 0,12 мкг/10⁶ клеток, в зависимости от клеточной линии [231].

Концентрация бора в глиальных стволовых клетках SU2 после инкубации с 5 мМ борфенилаланина в течение 24 часов составила 1,76 мкг/10⁷ клеток, что на 30 % меньше, чем концентрация бора в дифференцированных клетках глиомы человека SHG-44 (2,5 мкг/10⁷ клеток) [249].

Накопление бора клеточной культурой глиобластомы человека T98G при инкубации с борфенилаланином в концентрации бора 30 мкг/мл составило 0,2 мкг/10⁶ клеток, однако накопление бора клетками глиобластомы человека A172 было в 2 раза больше [150]. В другой работе концентрация бора в клетках T98G зависела от концентрации бора в культуральной среде при культивировании с борфенилаланином и золотыми наночастицами и увеличивалась с повышением концентрации от 10 мкг/мл до 40 мкг/мл, максимальная концентрация бора в клетках составила 0,549 мкг/10⁶ клеток [134]. В исследовании по накоплению борфенилаланина в повышающихся концентрациях было обнаружено, что клеточная культура глиомы человека U251 эффективнее поглощала бор в концентрации 6,25 мкг/мл, чем клетки меланомы кожи человека SK-Mel-28, однако при повышении концентрации бора в среде до 50 мкг/мл, накопление бора клетками меланомы происходило более активно, чем клетками глиомы и составило 1,7 и 3 мкг/10⁷ клеток для U251 и SK-Mel-28, соответственно [4].

Также, при инкубации клеток с борфенилаланином в течение 1–3 часа в концентрации 2 мМ (418 мкг/мл) было обнаружено, что клеточная культура меланомы мыши B16 накапливает бор в концентрации 19 мкг/10⁹ клеток, а культура крысиной глиомы F98 – в концентрации 13 мкг/10⁹ клеток [115], а при

инкубации клеток с этим же агентом в концентрации 3 мМ концентрация бора составила около $1,5 \text{ мкг}/10^7$ клеток для культур В16 (меланома мыши), С6 (глиома крысы) и СТ26 (клетки опухоли толстой кишки мыши) [119]. Схожие результаты были получены и при совместной инкубации клеток глиомы с 1 мМ боркаптата ($0,86 \text{ мкг}/10^7$ клеток) и 1 мМ борфенилаланина (около $3,3 \text{ мкг}/10^7$ клеток) на клеточной культуре F98 [120].

Полученные в данном исследовании результаты показали гетерогенное накопление бора и лития *in vitro* как при использовании препаратов доставки бора, так и при использовании лития карбоната, цитрата и хлорида. Наибольшие значения поглощения лития были получены на клетках мышинной меланомы В16 при инкубации с лития карбонатом ($0,8 \text{ мкг}/10^6$ клеток); однако клетки меланомы человека SK-Mel-28 активно накапливали как лития карбонат, так и лития цитрат (около $0,46 \text{ мкг}/10^6$ клеток для двух типов солей). Нормальные фибробласты человека также достаточно хорошо поглощали лития карбонат, при этом накопление лития цитрата и хлорида было значительно более низким. Концентрация бора при инкубации опухолевых клеток с борфенилаланином составила $0,29 \text{ мкг}/10^6$ клеток для клеточных культур SK-Mel-28 и В16. Таким образом, полученные результаты демонстрируют значительно более высокое поглощение опухолевыми клетками лития, в сравнении с бором, при инкубации с одобренными для клинического применения препаратами. Использование селективных агентов доставки лития может повысить его накопление опухолевыми клетками.

Известно, что внутриопухолевая гетерогенность клеток меланомы влияет на захват и накопление бора [33], возможно опухолевая гетерогенность также является причиной неоднородного накопления лития в клетках меланомы в нашем исследовании. В данной работе мы использовали соли лития, как неселективные агенты для доставки высоких доз лития в опухолевые клетки. Использованные дозы не являлись токсичными как для нормальных, так и для опухолевых клеток.

4.2. Биораспределение лития *in vivo*

Эффективное применение бор-нейтронозахватной терапии для лечения злокачественных новообразований зависит от двух основных факторов: доставка достаточного количества нейтронов в целевой объем опухоли и накопление достаточного количества атомов бора в клетках-мишенях [243]. Согласно литературным данным, для элиминации опухолевых клеток методом БНЗТ необходимо, чтобы в ткани опухоли была достигнута концентрация ^{10}B 20 мкг/г и более, что соответствует 10^9 атомов ^{10}B в опухолевой клетке [58]. Биораспределение бора зависит от борсодержащего препарата, пути введения и типа опухоли. В настоящее время накоплено большое количество данных по фармакокинетике двух агентов доставки бора 2-го поколения – борфенилаланина и боркаптата [38]. Результаты исследований указывают на проблему значительной вариабельности концентраций бора при применении этих агентов доставки бора в доклинических и клинических исследованиях БНЗТ [44; 51; 122; 47]. Причинами такой вариабельности могут являться внутриопухолевая гетерогенность, наличие стволовых опухолевых клеток, очагов гипоксии, клеток на разных стадиях клеточного цикла и механизмы накопления боркаптата за счет пассивной диффузии через фенестрированные капилляры опухоли [29; 171; 278].

Для определения накопления бора в тканях существует ряд методик, таких как масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой, АЭС-ИСП, альфа-ауторадиография высокого разрешения, альфа-спектроскопия, масс-спектрометрия вторичных ионов, позитронно-эмиссионная томография с борфенилаланином, меченным ^{18}F , гамма-спектроскопия, магнитно-резонансная томография с борфенилаланином, меченным ^{19}F и другие [42; 50; 52; 152; 184; 221; 277]. В данном исследовании накопление бора и лития определяли с помощью АЭС-ИСП, который является универсальным, чувствительным и быстрым методом [34; 54; 263].

Результаты исследования *in vivo* показали, что максимальная концентрация лития в опухоли была достигнута при введении лития карбоната в дозе 400 мг/кг

и составляла около 22 мкг/г, следовательно, целевая расчетная концентрация в 40 мкг/г не была достигнута. При этом соотношения концентраций лития опухоль/кожа и опухоль/кровь составило 1,5 и 2 соответственно. По данным литературы, несмотря на выше обозначенную проблему вариабельности концентраций бора в опухолевом очаге, а также снижение целевого значения 20 мкг/г ткани опухоли и соотношения концентраций бора в опухоли/окружающей ткани и опухоли/крови, зачастую проведение БНЗТ с сертифицированными препаратами бора оказывается успешным [47; 68].

Результаты биораспределения борфенилаланина, введенного внутрибрюшинно в дозе 350 мг/кг мышам с меланомой MEL-J, выявили, что пиковые концентрации бора в опухоли располагались в диапазоне от 11,7 до 52,0 мкг/г через 2 часа после введения препарата, что свидетельствует о значительной вариабельности концентраций в описанном эксперименте, соотношение концентраций бора опухоль/кровь и опухоль/кожа при этом составляло 4,3 и 2,5 соответственно [122].

В исследовании Sun T. и соавт. биораспределение бора у мышей с 2 типами ксенотрансплантатов глиомы не выявило различий в накоплении бора опухолью, максимальная концентрация составила 14,4 мкг/г для линии дифференцированных клеток глиомы человека и 11,3 мкг/г для линии стволовых клеток-редшественников через 2,5 часа после внутривенной инъекции 500 мг/кг борфенилаланина [249].

В исследовании Zhang Z. и соавт. оценивали накопление бора меланомой кожи у потенциальных пациентов для проведения БНЗТ после внутривенного введения борфенилаланина [45]. Максимальная концентрация бора определялась в диапазоне 15,59–30,05 мкг/г сразу после окончания инфузии. Соотношение концентраций бора опухоль/кровь для трех пациентов составило 1,48–3,82, а соотношение нормальная кожа/кровь – 0,81–1,99.

Garabalino M. A. и соавт. исследовали биораспределение бора после внутривенного введения боркаптата натрия в дозе 50 мг ^{10}B /кг у хомяков с раком полости рта. Концентрация бора в опухоли составила от 24 до 35 мкг/г в период

3–10 часов после инъекции, и снижалась до 9 мкг/г через 12 часов после введения препарата. Соотношение концентрации бора опухоль/нормальная ткань варьировало от 1,1 до 1,8. Авторы также отмечают, что концентрация бора в крови была стабильно выше, чем в опухоли на протяжении всего периода наблюдения, и составила от 31 до 67 мкг/мл, что связано с потенциальным риском повреждения сосудов во время БНЗТ. Также высокие значения были обнаружены в печени (до 214 мкг/г) и в почках (до 100 мкг/г) [44].

В исследовании биораспределения бора Faião-Flores и соавт. в течение 240 минут после внутрибрюшинного введения борфенилаланина в дозе 750 мг/кг мышам с привитой опухолью В16 было обнаружено, что концентрация бора в опухоли в 10 раз превышала значения, обнаруженные в крови через 150 минут после инъекции. Также авторы отмечают значительное повышение концентрации бора в крови в течение первых 120 минут, а также высокие значения в почках и кишечнике через 210 минут после инъекции [78].

В работе Wittig A. и соавт. было исследовано накопление бора на мышинной модели без опухоли через 1,5 часа после внутрибрюшинного введения борфенилаланина в концентрации 700 мг/кг и выявлены высокие концентрации в почках (38 мкг/г) и низкие в головном мозге (5 мкг/г). Через 2,5 часа после внутрибрюшинного введения боркаптата было также обнаружено высокое накопление бора в почках и печени (20 мкг/г) и низкое накопление в головном мозге (1 мкг/г). Также авторы отмечают крайне высокие концентрации бора в моче – от 2000 до 5500 мкг/г [43]. Известно, что Бор и его метаболиты выводятся преимущественно мочевыделительной системой, что объясняет высокие концентрации бора в почках [107; 121].

В данном исследовании также было выявлено, что максимальные концентрации лития наблюдались в почках, при введении лития в обеих дозировках в течение всего периода наблюдения, что объясняется наибольшим участием данного органа в элиминации лития из организма [137; 220].

Разработка новых агентов доставки бора является приоритетной задачей для повышения эффективности бор-нейтронозахватной терапии. Многочисленные

испытания направлены на синтез безопасных соединений, которые смогли бы обеспечить высокую концентрацию бора в опухоли и контрастность между опухолью и окружающими тканями для улучшения терапевтической эффективности БНЗТ [77; 79; 285]. Опубликованы результаты исследований по БНЗТ, в которых использовали препараты бора третьего поколения, такие как наночастицы, нанотрубки, полимеры, липосомы, аптамеры, белковые конъюгаты [32; 73; 98; 151; 208; 216; 218; 231; 250] и получили селективное высокое накопление бора в опухоли.

Принимая во внимание, что в данном исследовании был использован лития карбонат, при введении которого ионы лития неселективно поглощались опухолевыми клетками, можно предположить, что создание специальной конструкции с литием на основе селективного носителя, аналогично препаратам бора, существенно повысит накопление лития в опухоли.

Путь введения препарата может оказать существенное влияние на биораспределение вещества, в этой связи, возможно, также потребуются дальнейшие исследования, направленные на поиск оптимального пути введения лития. Так различия в распределении бора наблюдались при протоколе однократной инъекции и протоколе непрерывной инфузии препарата [95]. В исследовании Каныгина В. с соавт. было показано, что внутрибрюшинное введение позволило увеличить дозу борфенилаланина и боркаптата по сравнению с внутривенным введением. Также отмечалось, что внутрибрюшинные и внутриопухолевые инъекции борфенилаланина обеспечивают более высокую концентрацию бора в опухоли по сравнению с внутривенным путем введения [112].

4.3. Токсичность лития

Выведение лития осуществляется преимущественно почками (95 %) и зависит от возраста пациента, его массы тела и функции почек [94]. Выделяют три типа интоксикации литием – острую (acute), острую при хронической (acute-on-

chronic) и хроническую (chronic), которые зависят от фармакокинетики препаратов лития, времени приема и симптомов [282]. Острая интоксикация вызвана передозировкой у пациента, ранее не принимавшего литий. Хроническая интоксикация возникает, когда потребление лития превышает его выведение на постоянной основе. Острая при хронической интоксикация обусловлена передозировкой лития при хроническом его приеме [176]. Две последние формы более опасны, поскольку увеличивается риск токсического воздействия на центральную нервную систему (ЦНС), вследствие большего времени распределения лития в ЦНС [27; 131; 176; 237]. Такое явление связано с фармакокинетическим профилем лития – через несколько часов после приема литий распределяется по всему организму, однако наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) замедляет его проникновение в ЦНС. При постоянной терапии препаратами, содержащими литий, скорость элиминации лития также низкая, что способствует интоксикации, которая клинически проявляется тремором пальцев рук, когнитивными нарушениями, атаксией, сонливостью и головной болью. Повреждение почек является одним из наиболее распространенных побочных эффектов при применении препаратов лития, которое проявляется очаговой атрофией нефронов и интерстициальным фиброзом с относительным сохранением клубочков. Достоверно не известно, будет ли режим дозирования влиять на различия в частоте развития терминальной стадии почечной недостаточности [131].

По литературным данным, факторами риска развития литий-индуцированной нефропатии могут являться возраст, продолжительность приема препаратов и предшествующие эпизоды отравления препаратами лития [113; 181; 233]. Максимальная безопасная суточная доза при пероральном приеме лития для человека составляет 2400 мг [271]. Литий обладает узким терапевтическим индексом – целевая концентрация в крови для человека варьирует от 0,5 до 1,2 ммоль/л, побочные эффекты обычно встречаются у пациентов с концентрацией лития в плазме крови выше целевого значения [28]. По данным

литературы, фармакокинетика лития у человека значительно отличается от таковой у грызунов [133; 136; 207].

Известно, что литий свободно фильтруется в клубочках и в значительной степени реабсорбируется в проксимальных канальцах [157]. Реабсорбция белков из клубочкового фильтрата происходит в эпителиоцитах проксимальных канальцев почки за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза, в котором принимают участие многочисленные компоненты апикального эндоцитарного аппарата: везикулы, окаймленные клатрином; эндосомы; лизосомы и плотные апикальные канальцы. Белки, поглощенные путем эндоцитоза, транспортируются эндосомальной системой в лизосомы для последующей деградации, а рецепторы рециркулируют в апикальную плазматическую мембрану через плотные апикальные канальцы [201]. Морфологические изменения эндоцитарного компартмента характеризуют активность апикального эндоцитоза [175]. Таким образом, выявленные ультраструктурные изменения в содержании эндосом и плотных апикальных канальцев в эпителиоцитах проксимального отдела почки могут свидетельствовать о снижении реабсорбции и рециркуляции белков в условиях периферического опухолевого роста и при введении лития карбоната.

Существует ряд исследований, в которых было показано, что опухолевый процесс вызывает системные изменения в организме [190; 191], в частности влияет на структурную организацию почки [19; 270]. Было выявлено, что в условиях отдаленного опухолевого роста наблюдаются ультраструктурные признаки снижения эндоцитарной активности клеток проксимальных канальцев почки [19; 270]. Таким образом, можно сделать вывод, что ультраструктурные изменения, наблюдаемые через 7 суток в эпителии проксимальных канальцев мышей, получавших лития карбонат в дозе 300 мг/кг и 400 мг/кг, соответствовали изменениям в контрольной группе животных с отдаленным опухолевым ростом, и, вероятно, были связаны с прогрессирующим ростом опухоли и ее системным токсическим воздействием на организм экспериментальных животных.

Для выявления острого повреждения почек после введения высоких доз лития карбоната определяли уровни экспрессии белков-маркеров Kim-1 и NGAL.

Kim-1 (Kidney injury molecule 1) экспрессируются эпителиоцитами канальцев почки при повреждении и является биомаркером нефротоксичности [162; 299], NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) представляет собой белок-член суперсемейства липокалинов, в настоящее время рассматривается как наиболее ранний маркер острого повреждения почек [244; 299]. Несмотря на выявленное повышение экспрессии белков-маркеров Kim-1 и NGAL в группе мышей, получавших литий в дозе 400 мг/кг на временных точках 30 и 90 минут, через 7 суток после приема препарата отмечалось снижение данного параметра до значений, полученных в контрольной группе. Полученные данные соотносятся с результатами, выявленными в ходе светооптического исследования – определялись альтеративные изменения проксимальных канальцев на временных точках 90 и 180 минут, с последующей регенерацией эпителия через 7 суток. В исследовании Zhang P. L. и соавт. определяли экспрессию Kim-1 в тканях трансплантата почки с помощью иммуногистохимического анализа [161]. В группе пациентов без ОПП в 28 % случаев было обнаружено повышение экспрессии данного молекулярного маркера, однако в результате гистологического исследования повреждения канальцев выявлено не было. Авторы сделали вывод, что оценка уровней экспрессии Kim-1 в почке является более чувствительным методом, чем морфологическое исследование для выявления раннего повреждения почечных канальцев [161]. Учитывая все вышесказанное, можно предположить, что однократный прием лития с целью проведения ЛиНЗТ не приведет к нарушению функции почек, учитывая критерии включения и исключения пациентов по факторам риска, таким как наличие сопутствующих заболеваний.

В данной работе максимальная концентрация лития в крови при введении доз 300 и 400 мг/кг составляла 14 мкг/мл, что соответствует около 2,2 ммоль/л. Данное значение превышало терапевтические концентрации, однако известно, что период полувыведения лития равен 24 часам, а максимальная концентрация 2,2 ммоль/л была зафиксирована через 90 минут после введения препарата, что согласуется с данными о достижении пиковых концентраций лития у человека в

диапазоне 1–3 часа после перорального введения препарата [241]. Контроль концентрации лития в сыворотке крови у человека проводится, как правило, через 7 дней после начала терапии, когда достигается равновесное состояние лития в крови [108; 271]. При этом, известно, что умеренная токсичность лития проявляется при уровне до 2,5 ммоль/л [289].

При этом концентрация лития в головном мозге не превышала 4 мкг/г, и достигала фонового значения к 7-му дню эксперимента. Следует отметить, что период полувыведения лития при нормальной функции почек составляет около 20 часов, то есть высокие концентрации в плазме крови обычно возвращаются к терапевтическому диапазону в течение нескольких дней. Тяжелая нейротоксичность обычно возникает при хроническом применении препаратов лития, а не в результате острой передозировки [202]. Таким образом, можно предположить, что однократное введение лития карбоната в используемых дозах не окажет существенного фармацевтического воздействия на мозг.

Учитывая все вышесказанное, а также отсутствие достоверного снижения веса экспериментальных животных и патологических структурных и ультраструктурных изменений тканей почки на всех исследуемых сроках введения лития карбоната, а также умеренный уровень экспрессии белков-маркеров острого повреждения почек Kim-1 и NGAL через 7 дней после введения лития карбоната можно сделать вывод об отсутствии острой токсичности лития в использованном в данном исследовании протоколе введения лития.

ВЫВОДЫ

1. Выживаемость и клоногенная активность клеток меланомы кожи человека и мыши *in vitro* статистически значимо не снизилась при введении бора и лития в концентрациях 40 мкг/мл, требуемых для нейтронозахватной терапии.

2. При сравнительной оценке эффективности накопления опухолевыми клетками меланомы кожи человека (SK-Mel-28) и мыши (B16) *in vitro* выявлена более высокая концентрация лития в клетках в сравнении с концентрацией бора:

а) меланома кожи человека (SK-Mel-28): концентрация лития в клетках составила 0,45 мкг/10⁶ в сравнении с концентрацией бора – 0,29 мкг/10⁶;

б) меланома кожи мыши (B16) – концентрация лития в клетках составила 0,79 мкг/10⁶ в сравнении с концентрацией бора – 0,29 мкг/10⁶.

3. Максимальная концентрация лития в опухоли у мышей с имплантированной меланомой кожи B16, которая выявляется через 30 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг – 22,4 мкг/г, и в почках на всех временных точках (15, 30, 90 и 180 мин) – до 43 мкг/г; снижение концентрации лития в почке и опухоли (меланома) до контрольных значений происходит к 7 суткам после однократного введения препарата.

4. Выявлена динамика структурных изменений почки при введении лития карбоната, характеризующаяся дистрофией эпителия проксимальных канальцев на ранних сроках после введения препарата (15–180 минут), с последующим восстановлением структуры эпителиоцитов проксимальных канальцев через 7 суток:

а) через 30 минут после введения лития карбоната в дозах 300 и 400 мг/кг происходит повышение уровня экспрессии белков-маркеров Kim-1 и NGAL, что свидетельствует о его повреждающем воздействии с восстановлением уровней экспрессии данных белков до значений, полученных в контрольной группе через 7 суток.

5. Ультраструктурные изменения почки после введения лития карбоната проявляются:

а) набуханием эпителиоцитов проксимальных канальцев, снижением эндосом и плотных апикальных канальцев на ранних сроках эксперимента (15–180 минут), что свидетельствует о дистрофических изменениях с последующим увеличением количества эндосом и плотных апикальных канальцев эпителиоцитов при сохранении участков набухания цитоплазмы эпителиоцитов через 7 суток;

б) ультраструктура компонентов почечного фильтра (подоциты, гломерулярная базальная мембрана и эндотелиоциты) при введении высоких доз лития карбоната достоверно не отличается от соответствующих значений в контроле.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные результаты исследований *in vitro* могут применяться для практической реализации ЛиНЗТ на источнике эпитепловых нейтронов ускорительного типа с применением изотопа литий-6.
2. Полученные данные о биораспределении лития у лабораторных животных могут быть использованы для составления протокола проведения нейтронозахватной терапии на источниках эпитепловых нейтронов.
3. Полученные новые знания о влиянии однократного введения высоких доз лития на структурную и ультраструктурную организацию почки могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах фармакологии, патологической анатомии, психиатрии медицинских ВУЗов РФ, а также внедрены в лекционный курс кафедры ядерной медицины для подготовки специалистов в области бинарных методов лучевой терапии, в частности нейтронозахватной терапиейю.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЭС ИСП	атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
БНЗТ	бор-нейтронозахватная терапия
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ДМСО	диметилсульфоксид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛиНЗТ	литий-нейтронозахватная терапия
ЛК	лития карбонат
ЛПЭ	линейная передача энергии
ЛХ	лития хлорид
ЛЦ	лития цитрат
МТТ	тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид
НЗТ	нейтронозахватная терапия
СФО	Сибирский федеральный округ
НСО	Новосибирская область
ОБЭ	относительная биологическая эффективность
ОПП	острое повреждение почек
РФ	Российская Федерация
ФБС	фетальная бычья сыворотка
ХПН	хроническая почечная недостаточность
ЦНС	центральная нервная система
AUC _{0-t} area under the curve	площадь под фармакокинетической кривой с момента введения препарата до последней определяемой концентрации на временной точке
AUMC _{0-t} area under the mom	площадь под кривой первого момента

ent curve

C_{\max} максимальная концентрация вещества

DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12) модифицированная Дульбекко среда Игла в сочетании со средой Хэма

Modified Eagle Medium/F-12)

Kim-1 (Kidney injury molecule 1) трансмембранный белок, экспрессия которого повышается в проксимальных канальцах при остром повреждении почки

M (mean) среднее значение

NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) белок, экспрессия которого повышается в почечных канальцах при остром повреждении почки

lipocalin)

PBS (phosphate buffered saline) фосфатно-солевой буфер

SD (standard deviation) стандартное отклонение

TC_{\max} время достижения максимальной концентрации вещества

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова, О. В. Основы гистологии с гистологической техникой. Учебник / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий. – Москва : Медицина, 1982. – 304 с.
2. Гайворонский, И. В. Анатомия органов мочеполовой системы : учеб. пособие / И. В. Гайворонский, Г. И. Ничипорук. – Санкт-Петербург : ЭЛБИ-СПб, 2006. – 80 с.
3. Гистология для патологоанатомов / под ред. М. Р. Линдберг, Л. В. Лэмпс ; пер. с англ. – Москва : Практическая медицина, 2022. – 492 с.
4. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – Москва : МНИОИ им. П. А. Герцена, 2022. – 252 с. – ISBN 978-5-85502-280-3.
5. Исследование биологической эффективности бор-нейтронозахватной терапии на клетках глиомы и меланомы человека / А. И. Касатова, В. В. Каныгин, И. А. Разумов [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 110–116.
6. Климанов, В. А. Радиобиологическое и дозиметрическое планирование лучевой и радионуклидной терапии. Часть 1. Радиобиологические основы лучевой терапии. Радиобиологическое и дозиметрическое планирование дистанционной лучевой терапии пучками тормозного и гамма-излучения и электронами : учеб. пособие / В. А. Климанов. – Москва : НИЯУ МИФИ, 2011. - 500 с.
7. Кузнецов, С. Л. Гистология, цитология и эмбриология. Учебник / С. Л. Кузнецов, Н. Н. Мушкамбаров. – 3-е изд., испр. и доп. – Москва : МИА, 2016. – 640 с. – ISBN 978-5-9986-0249-8.
8. Линденбраттен, Л. Д. Медицинская радиология. Основы лучевой диагностики и лучевой терапии / Л. Д. Линденбраттен, И. П. Королук. – 2-е изд. – Москва : Медицина, 2000. – 671 с.

9. Лопухин, Ю. М. Ультраструктурные основы жизнеспособности печени, почек и сердца : атлас / Ю. М. Лопухин, Э. М. Коган, Я. Л. Караганов. – Москва : Медицина, 1977. – 256 с.
10. Новосибирскстат : [сайт]. – Новосибирск. – URL : https://novosibstat.gks.ru/storage/mediabank/bvPAoRkg/p54_PRESS164_2020.pdf (дата обращения: 12.03.23). – Текст : электронный.
11. Получение наночастиц элементного бора методом ультразвуковой обработки в водной среде и их применение в бор-нейтронозахватной терапии / С. А. Успенский, П. А. Хаптаханова, А. А. Заборонок [и др.] // Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах. – 2020. – Т. 491, № 1. – С. 20–24.
12. Практикум по гистологии мочеполовой системы : учеб.-метод. пособие / сост. Л. С. Васильева, В. Г. Изатулин, Л. А. Иванова [и др.]; ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России. – Иркутск : ИГМУ, 2014. – 68 с.
13. Практические рекомендации по общим принципам проведения противоопухолевой лекарственной терапии / А. А. Трякин, Н. С. Бесова, Н. М. Волков [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2022. – Т. 12, № 3S2–1. – С. 27–40.
14. Репарация неспаренных оснований и петель делеции/вставки ДНК у эукариот / Л. О. Гуцол, И. Э. Егорова, С. Ф. Непомнящих [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. – 2016. – Т. 1, № 3–1(109). – С. 71–75.
15. Скворцов, В. В. Клиническая нефрология : краткий курс / В. В. Скворцов, А. В. Тумаренко. – Санкт-Петербург : СпецЛит, 2017. – 199 с. – ISBN 978-5-299-00770-1.
16. Таблицы физических величин : справочник / под ред. И. К. Кикоина. – Москва : Атомиздат, 1976. – 1008 с.
17. Таскаев, С. Ю. Бор-нейтронозахватная терапия / С. Ю. Таскаев, В. В. Каныгин. – Новосибирск : Издательство СО РАН, 2016. – 216 с. – ISBN 978-5-7692-1500-1.

18. Таскаев, С. Ю. Бор-нейтронозахватная терапия злокачественных опухолей: основы, история и текущее состояние / С. Ю. Таскаев // Онкологический журнал: лучевая диагностика, лучевая терапия. – 2019. – Т. 2, № 2. – С. 66–83.

19. Ультраструктура эпителия проксимальных канальцев почки при пероральном введении карбоната лития в условиях опухолевого роста / Н. П. Бгатова, А. М. Рахметова, Ш. М. Жумадина [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2023. – Т. 12, № 4. – С. 42–52.

20. Хэм, А. Гистология / А. Хэм, Д. Кормак ; под ред. Ю. И. Афанасьева, Ю. С. Ченцова ; пер. с англ.. – Москва : Мир, 1983. – Т. 5. – 1360 с.

21. Экспериментальное подтверждение противоопухолевой эффективности нейтрон-захватной терапии с гадолинием / А. А. Липенгольц, А. М. Арнопольская, И. Н. Шейно, В. Н. Кулаков // Онкологический журнал: лучевая диагностика, лучевая терапия. – 2020. – Т. 3, № 2. – С. 63–70.

22. A 5-Year Study of Lithium and Valproic Acid Drug Monitoring in Patients with Bipolar Disorders in an Italian Clinical Center / M. Carli, E. Risaliti, M. Francomano [et al.] // Pharmaceuticals (Basel). – 2022. – Vol. 15, N 1. – P. 105.

23. A novel concept of treatment of diffuse or multiple pleural tumors by boron neutron capture therapy (BNCT) / M. Suzuki, K. Endo, H. Satoh [et al.] // Radiother. Oncol. – 2008. – Vol. 88, N 2. – P. 192–195.

24. A Review for lithium: pharmacokinetics, drug design, and toxicity / J. Wen, D. Sawmiller, B. Wheeldon, J. Tan // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. – 2019. – Vol. 18. – P. 769–778.

25. A Review of Boron Neutron Capture Therapy: Its History and Current Challenges / W. H. Jin, C. Seldon, M. Butkus [et al.] // Int. J. Part Ther. – 2022. – Vol. 9, N 1. – P. 71–82.

26. A systematic review on the usage of averaged LET in radiation biology for particle therapy / F. Kalholm, L. Grzanka, E. Traneus, N. Bassler // Radiother. Oncol. – 2021. – Vol. 161. – P. 211–221.

27. Adityanjee, A. The syndrome of irreversible lithium-effectuated neurotoxicity / A. Adityanjee, K. R. Munshi, A. Thampy // *Clin. Neuropharmacol.* – 2005. – Vol. 28, N 1. – P. 38–49.
28. Advances in therapeutic monitoring of lithium in the management of bipolar disorder / M. Sheikh, M. Qassem, I. F. Triantis, P. A. Kyriacou // *Sensors (Basel)*. – 2022. – Vol. 22. – P. 736.
29. An attempt to improve the therapeutic effect of boron neutron capture therapy using commonly employed ^{10}B -carriers based on analytical studies on the correlation among quiescent tumor cell characteristics, tumor heterogeneity and cancer stemness / S. I. Masunaga, Y. Sanada, K. Tano [et al.] // *J. Radiat. Res.* – 2020. – Vol. 61, N 6. – P. 876–885.
30. Annual report to the nation on the status of cancer, part 1: national cancer statistics / F. Islami, E. M. Ward, H. Sung [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2021. – Vol. 113, N 12. – P. 1648–1669.
31. Application of BNCT to the treatment of HER2+ breast cancer recurrences: Research and developments in Argentina / M. A. Gadan, S. J. Gonzalez, M. Batalla [et al.] // *Appl. Radiat. Isot.* – 2015. – Vol. 104. – P. 155–159.
32. Aptamers for Addressed Boron Delivery in BNCT: Effect of Boron Cluster Attachment Site on Functional Activity / D. S. Novopashina, M. A. Dymova, A. S. Davydova [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 24, N 1. – P. 306.
33. Assessment of biological effectiveness of boron neutron capture therapy in primary and metastatic melanoma cell lines / A. E. Rossini, M. A. Dagrosa, A. Portu [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2015. – Vol. 91, N 1. – P. 81–89.
34. Atomic emission method for total boron in blood during neutron-capture therapy / J. Laakso, M. Kulvik, I. Ruokonen [et al.] // *Clin. Chem.* – 2001. – Vol. 47, N 10. – P. 1796–1803.
35. Azzam, E. I. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury / E. I. Azzam, J. P. Jay-Gerin, D. Pain // *Cancer Lett.* – 2012. – Vol. 327, N 1-2. – P. 48–60.

36. Baldessarini, R. J. Bipolar depression: a major unsolved challenge / R. J. Baldessarini, G. H. Vázquez, L. Tondo // *Int. J. Bipolar Disord.* – 2020. – Vol. 8, N 1. – P. 1.
37. Barth, R. F. Boron neutron capture therapy at the crossroads – Where do we go from here? / R. F. Barth, J. C. Grecula // *Appl. Radiat. Isot.* – 2020. – Vol. 160. – P. 109029.
38. Barth, R. F. Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer / R. F. Barth, P. Mi, W. Yang // *Cancer Commun. (Lond).* – 2018. – Vol. 38, N 1. – P. 35.
39. Bartlett, C. S. Vascular Growth Factors and Glomerular Disease / C. S. Bartlett, M. Jeansson, S. E. Quaggin // *Annu. Rev. Physiol.* – 2016. – Vol. 78. – P. 437–461.
40. Beam shaping assembly design of ${}^7\text{Li}(p,n){}^7\text{Be}$ neutron source for boron neutron capture therapy of deep-seated tumor / L. Zaidi, M. Belgaid, S. Taskaev, R. Khelifi // *Appl. Radiat. Isot.* – 2018. – Vol. 139. – P. 316–324.
41. Bgatova, N. Influence of distant tumor growth and lithium treatment on ultrastructural organization of kidney proximal tubules / N. Bgatova, I. Taskaeva, V. Makarova. – DOI 10.1080/01913123.2021.1954735. – Text : electronic // *Ultrastruct. Pathol.* – 2021. – Vol. 45, N 3. – P. 212–223. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34304707/> (date of access: 10.04.2024).
42. Biodistribution and subcellular localization of an unnatural boron-containing amino acid (cis-ABCPC) by imaging secondary ion mass spectrometry for neutron capture therapy of melanomas and gliomas / S. Chandra, R. F. Barth, S. A. Haider [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 9. – P. e75377.
43. Biodistribution of $(10)\text{B}$ for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in a mouse model after injection of sodium mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate and l-para-boronophenylalanine / A. Wittig, R. Huiskamp, R. L. Moss [et al.] // *Radiat. Res.* – 2009. – Vol. 172, N 4. – P. 493–499.

44. Biodistribution of sodium borocaptate (BSH) for boron neutron capture therapy (BNCT) in an oral cancer model / M. A. Garabalino, E. M. Heber, A. M. Hughes [et al.] // *Radiat. Environ. Biophys.* – 2013. – Vol. 52, N 3. – P. 351–361.
45. Biodistribution studies of bo-ronophenylalanine in different types of skin melanoma / Z. Zhang, Z. Yong, C. Jin [et al.] // *Appl. Radiat. Isot.* – 2020. – Vol. 163. – P. 109215.
46. Biofilms: The Microbial «Protective Clothing» in Extreme Environments / W. Yin, Y. Wang, L. Liu, J. He // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, N 14. – P. 3423.
47. Biokinetic analysis of tissue boron (^{10}B) concentrations of glioma patients treated with BNCT in Finland / H. Koivunoro, E. Hippelainen, I. Auterinen [et al.] // *Appl. Radiat. Isot.* – 2015. – Vol. 106. – P. 189–194.
48. Bipolar disorders / R. S. McIntyre, M. Berk, E. Brietzke [et al.] // *Lancet.* – 2020. – Vol. 396 (10265). – P. 1841–1856.
49. Boni, V. The resurgence of antibody drug conjugates in cancer therapeutics: novel targets and payloads / V. Boni, M. R. Sharma, A. Patnaik // *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* – 2020. – Vol. 40. – P. e58–e74.
50. Boron analysis and boron imaging in biological materials for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) / A. Wittig, J. Michel, R. L. Moss [et al.] // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2008. – Vol. 68, N 1. – P. 66–90.
51. Boron biodistribution study in colorectal liver metastases patients in Argentina / J. Cardoso, S. Nievas, M. Pereira [et al.] // *Appl. Radiat. Isot.* – 2009. – Vol. 67, Suppl. 7–8. – P. 76–79.
52. Boron concentration measurements by alpha spectrometry and quantitative neutron autoradiography in cells and tissues treated with different boronated formulations and administration protocols / S. Bortolussi, L. Ciani, I. Postuma [et al.] // *Appl. Radiat. Isot.* – 2014. – Vol. 88. – P. 78–80.
53. Boron containing macromolecules and nanovehicles as delivery agents for neutron capture therapy / G. Wu, R. F. Barth, W. Yang [et al.] // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2006. – Vol. 6, N 2. – P. 167–184.

54. Boron detection from blood samples by ICP-AES and ICP-MS during boron neutron capture therapy / S. Linko, H. Revitzer, R. Zilliacus [et al.] // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 2008. – Vol. 68, N 8. – P. 696–702.

55. Boron neutron capture therapy (BNCT) followed by intensity modulated chemoradiotherapy as primary treatment of large head and neck cancer with intracranial involvement / L. Kankaanranta, K. Saarilahti, A. Makitie [et al.] // *Radiother. Oncol.* – 2011. – Vol. 99, N 1. – P. 98–99.

56. Boron neutron capture therapy (BNCT) for newly-diagnosed glioblastoma: comparison of clinical results obtained with BNCT and conventional treatment / T. Kageji, S. Nagahiro, Y. Mizobuchi [et al.] // *J. Med. Invest.* – 2014. – Vol. 61, N 3–4. – P. 254–263.

57. Boron neutron capture therapy demonstrated in mice bearing EMT6 tumors following selective delivery of boron by rationally designed liposomes / P. J. Kueffer, C. A. Maitz, A. A. Khan [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – Vol. 110, N 16. – P. 6512–6517.

58. Boron neutron capture therapy for cancer. Realities and prospect / R. F. Barth, A. H. Soloway, R. G. Fairchild, R. M. Brugger // *Cancer.* – 1992. – Vol. 70, N 12. – P. 2995–3007.

59. Boron Neutron Capture Therapy for High-Grade Skull-Base Meningioma / K. Takeuchi, S. Kawabata, R. Hiramatsu [et al.] // *J. Neurol. Surg. B Skull Base.* – 2018. – Vol. 79, Suppl. 4. – P. 322–S327.

60. Boron neutron capture therapy for locally recurrent head and neck squamous cell carcinoma: An analysis of dose response and survival / H. Koivunoro, L. Kankaanranta, T. Seppala [et al.] // *Radiother. Oncol.* – 2019. – Vol. 137. – P. 153–158.

61. Boron neutron capture therapy for malignant tumors related to meningiomas / S. Miyatake, Y. Tamura, S. Kawabata [et al.] // *Neurosurgery.* – 2007. – Vol. 61, N 1. – P. 82–90.

62. Boron neutron capture therapy for recurrent high-grade meningiomas / S. Kawabata, R. Hiramatsu, T. Kuroiwa [et al.] // *J. Neurosurg.* – 2013. – Vol. 119, N 4. – P. 837–844.

63. Boron neutron capture therapy for vulvar melanoma and genital extramammary Paget's disease with curative responses / J. Hiratsuka, N. Kamitani, R. Tanaka [et al.] // *Cancer Commun (Lond).* – 2018. – Vol. 38, N 1. – P. 38.

64. Boron neutron capture therapy in the treatment of locally recurred head and neck cancer / L. Kankaanranta, T. Seppälä, H. Koivunoro [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2007. – Vol. 69, N 2. – P. 475–482.

65. Boron neutron capture therapy in the treatment of locally recurred head-and-neck cancer: final analysis of a phase I/II trial / L. Kankaanranta, T. Seppala, H. Koivunoro [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2012. – Vol. 82, N 1. – P. 67–75.

66. Boron Neutron Capture Therapy in the Treatment of Recurrent Laryngeal Cancer / A. Haapaniemi, L. Kankaanranta, R. Saat [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2016. – Vol. 95, N 1. – P. 404–410.

67. Boron neutron capture therapy of a rat glioma / N. Clendenon, R. Barth, W. Gordon [et al.] // *Neurosurgery.* – 1990. – Vol. 26. – P. 47–55.

68. Boron neutron capture therapy of brain tumors: biodistribution, pharmacokinetics, and radiation dosimetry sodium borocaptate in patients with gliomas / J. H. Goodman, W. Yang, R. F. Barth [et al.] // *Neurosurgery.* – 2000. – Vol. 47, N 3. – P. 608–621.

69. Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival following intracarotid injection of either sodium borocaptate or boronophenylalanine with or without blood-brain barrier disruption / R. F. Barth, W. Yang, J. H. Rotaru [et al.] // *Can. Respir. J.* – 1997. – Vol. 57. – P. 1129–1136.

70. Boron neutron capture therapy of malignant gliomas / S. I. Miyatake, S. Kawabata, R. Hiramatsu [et al.] // *Prog. Neurol. Surg.* – 2018. – Vol. 32. – P. 48–56.

71. Boron neutron capture therapy outcomes for advanced or recurrent head and neck cancer / M. Suzuki, I. Kato, T. Aihara [et al.] // *J. Radiat. Res.* – 2014. – Vol. 55, N 1. – P. 146–153.

72. Boron neutron capture therapy using cyclotron-based epithermal neutron source and borofalan (^{10}B) for recurrent or locally advanced head and neck cancer (JHN002): An open-label phase II trial / K. Hirose, A. Konno, J. Hiratsuka [et al.] // *Radiother. Oncol.* – 2021. – Vol. 155. – P. 182–187.

73. Boron neutron capture therapy using dodecaborated albumin conjugates with maleimide is effective in a rat glioma model / H. Kashiwagi, S. Kawabata, K. Yoshimura [et al.] // *Invest. New Drugs.* – 2022. – Vol. 40, N 2. – P. 255–264.

74. Boron Neutron Capture Therapy: A Review of Clinical Applications / T. D. Malouff, D. S. Seneviratne, D. K. Ebner [et al.] // *Front. Oncol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 601820.

75. Boron Neutron Capture Therapy: Current Status and Challenges / S. Wang, Z. Zhang, L. Miao, Y. Li // *Front Oncol.* – 2022. – Vol. 12. – P. 788770.

76. Boron neutron capture therapy: Current status and future perspectives / M. A. Dymova, S. Y. Taskaev, V. A. Richter, E. V. Kuligina // *Cancer Commun. (Lond).* – 2020. – Vol. 40. – P. 406–421.

77. Boron neutron capture therapy: Moving toward targeted cancer therapy / H. R. Mirzaei, A. Sahebkar, R. Salehi [et al.] // *J. Cancer Res. Ther.* – 2016. – Vol. 12, N 2. – P. 520–525.

78. Boron uptake in normal melanocytes and melanoma cells and boron biodistribution study in mice bearing B16F10 melanoma for boron neutron capture therapy / F. Faião-Flores, P. R. Coelho, J. D. Arruda-Neto [et al.] // *Radiat. Environ. Biophys.* – 2012. – Vol. 51, N 3. – P. 319–329.

79. Boron Vehiculating Nanosystems for Neutron Capture Therapy in Cancer Treatment / G. Ailuno, A. Balboni, G. Caviglioli [et al.]. – DOI 10.3390/cells11244029. – Text : electronic // *Cells.* – 2022. – Vol. 11, N 24. – P. 4029. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36552793/> (date of access: 14.03.2024).

80. Brain Tumour Study Group. Boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma multiforme: a phase II study evaluating a prolonged high-dose of boronophenylalanine (BPA) / R. Henriksson, J. Capala, A. Michanek [et al.] // *Radiother. Oncol.* – 2008. – Vol. 88, N 2. – P. 183–191.
81. Cade, J. F. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement / J. F. Cade // *Bull. World Health Organ.* – 1949. – Vol. 78, N 4. – P. 518–520.
82. Campanholle, G. TLR-2/TLR-4 TREM-1 signaling pathway is dispensable in inflammatory myeloid cells during sterile kidney injury / G. Campanholle, K. Mittelsteadt, S. Nakagawa // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 7. – P. e68640.
83. Can, A. Molecular actions and clinical pharmacogenetics of lithium therapy / A. Can, T. G. Schulze, T. D. Gould // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2014. – Vol. 123. – P. 3–16.
84. Chadwick, J. Possible Existence of a Neutron / J. Chadwick // *Nature.* – 1932. – Vol. 129. – P. 312.
85. Challenges and opportunities in the PD1/PDL1 inhibitor clinical trial landscape / S. Upadhaya, S. T. Neftelinov, J. Hodge, J. Campbell // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2022. – Vol. 21, N 7. – P. 482–483.
86. Cheng, X. Boron Neutron Capture Therapy: Clinical Application and Research Progress / X. Cheng, F. Li, L. Liang // *Curr. Oncol.* – 2022. – Vol. 29, N 10. – P. 7868–7886.
87. Chung, J. J. Single-Cell Transcriptome Profiling of the Kidney Glomerulus Identifies Key Cell Types and Reactions to Injury / J. J. Chung, L. Goldstein, Y. J. Chen // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2020. – Vol. 31, N 10. – P. 2341–2354.
88. Citrin, D. E. Recent Developments in Radiotherapy / D. E. Citrin // *N. Engl. J. Med.* – 2017. – Vol. 377, N 11. – P. 1065–1075.
89. Clinical lessons from the first applications of BNCT on unresectable liver metastases / A. Zonta, U. Prati, L. Roveda [et al.] // *J. Phys. Conf. Ser.* – 2006. – Vol. 41. – P. 484–495.

90. Clinical review of the Japanese experience with boron neutron capture therapy and a proposed strategy using epithermal neutron beams / Y. Nakagawa, K. Pooh, T. Kobayashi [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2003. – Vol. 62, N 1–2. – P. 87–99.
91. Clinical trials for recurrent head and neck cancer at the Tsing-Hua Open-Pool Reactor (THOR) in Taiwan / L-W. Wang, Y-W. H. Liu, F-I. Chou [et al.] // *Cancer Commun.* – 2018. – Vol. 38, N 1. – P. 1–7.
92. Clonogenic assay of cells in vitro / N. A. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap [et al.] // *Nat. Protoc.* – 2006. – Vol. 1, N 5. – P. 2315–2319.
93. Coderre, J. A. The radiation biology of boron neutron capture therapy / J. A. Coderre, G. M. Morris // *Radiat. Res.* – 1999. – Vol. 151, N 1. – P. 1–18.
94. Combination of Olanzapine and Samidorphan has no clinically significant effect on the pharmacokinetics of Lithium or Valproate / L. Sun, S. Yagoda, B. Yao [et al.] // *Clin. Drug Investig.* – 2020. – Vol. 40. – P. 55–64.
95. Comparison of the pharmacokinetics between L-BPA and L-FBPA using the same administration dose and protocol: a validation study for the theranostic approach using [18F]-L-FBPA positron emission tomography in boron neutron capture therapy / T. Watanabe, Y. Hattori, Y. Ohta [et al.] // *BMC Cancer.* – 2016. – Vol. 16. – P. 859.
96. Complex DNA Damage Induced by High Linear Energy Transfer Alpha-Particles and Protons Triggers a Specific Cellular DNA Damage Response / R. J. Carter, C. M. Nickson, J. M. Thompson [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2018. – Vol. 100, N 3. – P. 776–784.
97. Corcoran, A. C. Lithium poisoning from the use of salt substitutes / A. C. Corcoran, R. D. Taylor, I. H. Page // *J. Am. Med. Assoc.* – 1949. – Vol. 139, N 11. – P. 685–688.
98. Covalent organic polymer as a carborane carrier for imaging-facilitated boron neutron capture therapy / Y. Shi, Q. Fu, J. Li [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2020. – Vol. 12. – P. 55564–55573.

99. Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer / R. F. Barth, M. G. Vicente, O. K. Harling [et al.] // *Radiat. Oncol.* – 2012. – Vol. 7. – P. 146.
100. Cutaneous melanoma / G. V. Long, S. M. Swetter, A. M. Menzies [et al.] // *Lancet.* – 2023. – Vol. 402 (10400). – P. 485–502.
101. Daehn, I. S. The glomerular filtration barrier: a structural target for novel kidney therapies / I. S. Daehn, J. S. Duffield. – DOI 10.1038/s41573-021-00242-0. – Text : electronic // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2021. – Vol. 20, N 10. – P. 770–788. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34262140/> (date of access: 10.04.2024).
102. Davis, L. E. Current state of melanoma diagnosis and treatment / L. E. Davis, S. C. Shalin, A. Tackett // *Cancer Biol. Ther.* – 2019. – Vol. 20, N 11. – P. 1366–1379.
103. Dennis, M. Data leak shows Carvykti cuts risk of progression, death by 74 % in myeloma study / M. Dennis // *FirstWord Pharma* : [website]. – 2023. – URL : <https://firstwordpharma.com/> (date of access: 14.03.2024). – Text : electronic.
104. Devarajan, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin--an emerging troponin for kidney injury / P. Devarajan // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2008. – Vol. 23, N 12. – P. 3737–3743.
105. Diaz, A. Z. Assessment of the results from the phase I/II boron neutron capture therapy trials at the Brookhaven National Laboratory from a clinician's point of view / A. Z. Diaz // *J. Neurooncol.* – 2003. – Vol. 62, N 1–2. – P. 101–109.
106. Difference in BPA uptake between glioma stem-like cells and their cancerous cells / F. Yoshida, T. Kurita, K. Endo [et al.] // *Appl. Radiat. Isot.* – 2020. – Vol. 164. – P. 109234.
107. Direct comparison of radiation dosimetry of six PET tracers using human whole-body imaging and murine biodistribution studies / M. Sakata, K. Oda, J. Toyohara [et al.] // *Ann. Nucl. Med.* – 2013. – Vol. 27, N 3. – P. 285–296.
108. Dodds, G. Lithium therapy / G. Dodds // *Scott. Med. J.* – 2000. – Vol. 45. – P. 171–173.

109. Dose-dependent transcriptional effects of lithium and adverse effect burden in a psychiatric cohort / F. Krull, I. Akkouh, T. Hughes [et al.] // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2022. – Vol. 112. – P. 110408.
110. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin / K. M. Schmidt-Ott, K. Mori, J. Y. Li [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2007. – Vol. 18, N 2. – P. 407–413.
111. Duann, P. Mitochondria Damage and Kidney Disease / P. Duann, P. H. Lin // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – Vol. 982. – P. 529–551.
112. Effectiveness of different BNCT-drug injection methods / V. Kanygin, A. Tsygankova, A. Kichigin [et al.] // *Proceedings of the RAP Conference.* – Thessaloniki, Greece, 2020. – Vol. 5. – P. 33–37.
113. Effects of 10 to 30 years of lithium treatment on kidney function / H. Aiff, P. O. Attman, M. J. Aurell [et al.] // *Psychopharmacol.* – 2015. – Vol. 29. – P. 608–614.
114. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection / J. A. Reisz, N. Bansal, J. Qian [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2014. – Vol. 21, N 2. – P. 260–292.
115. Effects of l-DOPA pre-loading on the uptake of boronophenylalanine using the F98 glioma and B16 melanoma models / W. Yang, R. F. Barth, T. Huo [et al.] // *Appl. Radiat. Isot.* – 2014. – Vol. 88. – P. 69–73.
116. El-Mallakh, R. S. Ion homeostasis and the mechanism of action of lithium / R. S. El-Mallakh // *Clin. Neurosci. Res.* – 2004. – Vol. 4, N 3–4. – P. 227–231.
117. Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment / S. Jin, Y. Sun, X. Liang [et al.] // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2022. – Vol. 7, N 1. – P. 39.
118. Endothelium structure and function in kidney health and disease / N. Jourde-Chiche, F. Fakhouri, L. Dou [et al.] // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2019. – Vol. 15, N 2. – P. 87–108.
119. Evaluation of a Novel Boron-Containing α -D-Mannopyranoside for BNCT / T. Tsurubuchi, M. Shirakawa, W. Kurosawa [et al.] // *Cells.* – 2020. – Vol. 9, N 5. – P. 1277.

120. Evaluation of a novel sodium borocaptate-containing unnatural amino acid as a boron delivery agent for neutron capture therapy of the F98 rat glioma / G. Futamura, S. Kawabata, N. Nonoguchi [et al.] // *Radiat. Oncol.* – 2017. – Vol. 12, N 1. – P. 26.

121. Evaluation of pharmacokinetics of boronophenylalanine and its uptakes in gastric cancer / F. Tang, Y. Wei, S. Zhang [et al.] // *Front Oncol.* – 2022. – Vol. 12. – N 925671.

122. Experimental Studies of Boronophenylalanine ((10)BPA) Biodistribution for the Individual Application of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for Malignant Melanoma Treatment / M. Carpano, M. Perona, C. Rodriguez [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2015. – Vol. 93, N 2. – P. 344–352.

123. Extra-corporeal liver BNCT for the treatment of diffuse metastases: what was learned and what is still to be learned / A. Zonta, T. Pinelli, U. Prati [et al.] // *Appl Radiat Isot.* – 2009. – Vol. 67 (7-8 Suppl). – P. 67–75.

124. Ferenbach, D. A. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD / D. A. Ferenbach, J. V. Bonventre // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2015. – Vol. 11, N 5. – P. 264–276.

125. Ferroptosis, radiotherapy, and combination therapeutic strategies / G. Lei, C. Mao, Y. Yan [et al.] // *Protein Cell.* – 2021. – Vol. 12, N 11. – P. 836–857.

126. Finley, P. R. Drug Interactions with Lithium: An Update / P. R. Finley // *Clin. Pharmacokinet.* – 2016. – Vol. 55, N 8. – P. 925–941.

127. First attempt of boron neutron capture therapy (BNCT) for hepatocellular carcinoma / M. Suzuki, Y. Sakurai, S. Hagiwara [et al.] // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 37, N 5. – P. 376–381.

128. Fountoulakis, K. N. Lithium treatment of Bipolar disorder in adults: A systematic review of randomized trials and meta-analyses / K. N. Fountoulakis, M. Tohen, C. A. Jr. Zarate. – DOI 10.1016/j.euroneuro.2021.10.003. – Text : electronic // *Eur. Neuropsychopharmacol.* – 2022. – Vol. 54. – P. 100–115. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34980362/> (date of access: 21.05.2024).

129. Gaschler, M. M. Lipid peroxidation in cell death / M. M. Gaschler, B. R. Stockwell // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 482, N 3. – P. 419–425.

130. Gaut, J. P. Acute kidney injury pathology and pathophysiology: a retrospective review / J. P. Gaut, H. Liapis // *Clin Kidney J.* – 2020. – Vol. 14 (2). – P. 526–536.

131. Gitlin, M. Lithium side effects and toxicity: prevalence and management strategies / M. Gitlin // *Int. J. Bipolar Disord.* – 2016. – Vol. 4, N 1. – P. 27.

132. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2021. – Vol. 71, N 3. – P. 209–249.

133. Gochfeld, M. Sex differences in human and animal toxicology / M. Gochfeld // *Toxicol. Pathol.* – 2017. – Vol. 45, N 1. – P. 172–189.

134. Gold Nanoparticles Permit In Situ Absorbed Dose Evaluation in Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Tumors / A. Zaboronok, S. Taskaev, O. Volkova [et al.] // *Pharmaceutics.* – 2021. – Vol. 13. – P. 1490.

135. Gorkin, R. A. Lithium ion accumulation by cultured glioma cells / R. A. Gorkin, E. Richelson // *Brain Res.* – 1979. – Vol. 171, N 2. – P. 365–368.

136. Gould, T. D. Targeting glycogen synthase kinase-3 as an approach to develop novel mood-stabilising medications / T. D. Gould // *Expert Opin. Ther. Targets.* – 2006. – Vol. 10, N 3. – P. 377–392.

137. Grandjean, E. M. Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach. Part II: Clinical pharmacology and therapeutic monitoring / E. M. Grandjean, J. M. Aubry // *CNS Drugs.* – 2009. – Vol. 23, N 4. – P. 331–349.

138. Guerci, P. The macro- and microcirculation of the kidney / P. Guerci, B. Ergin, C. Ince // *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* – 2017. – Vol. 31, N 3. – P. 315–329.

139. Hartman, R. I. Cutaneous Melanoma-A Review in Detection, Staging, and Management / R. I. Hartman, J. Y. Lin // *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* – 2019. – Vol. 33, N 1. – P. 25–38.

140. Hatanaka, H. Clinical results of boron neutron capture therapy / H. Hatanaka // *Basic Life Sci.* – 1990. – Vol. 54, N 15. – P. 15–21.

141. Hatanaka, H. Clinical results of long-surviving brain tumor patients who underwent boron neutron capture therapy / H. Hatanaka, Y. Nakagawa // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1994. – Vol. 28. – P. 1061–1066.

142. Hawkins, C. L. Generation and propagation of radical reactions on proteins / C. L. Hawkins, M. J. Davies // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – Vol. 1504, N 2–3. – P. 196–219.

143. Helwick, C. Challenges of accurately identifying HER2-low breast cancers / C. Helwick // *The ASCO Post* : [website]. – 2023. – URL : <https://ascopost.com/issues/february-25-2023/> (дата обращения : 10.06.2024). – Text : electronic.

144. Hemodialysis Treatment for Patients with Lithium Poisoning / Y. H. Liu, K. F. Tsai, P. C. Hsu [et al.] // *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* – 2022. – Vol. 19, N 16. – P. 10044.

145. Hestbech, J. Lithium-induced focal interstitial fibrosis in the rat kidney / J. Hestbech, O. V. Olesen, K. Thomsen // *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [A].* – 1978. – Vol. 86, N 2. – P. 195–197.

146. Hetmar, O. The impact of long-term lithium treatment on renal function and structure / O. Hetmar // *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* – 1988. – Vol. 345. – P. 85–89.

147. Huang, R. X. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer / R. X. Huang, P. K. Zhou // *Signal Transduct. Target Ther.* – 2020. – Vol. 5, N 1. – P. 60.

148. Ichimura, K. Actin filament organization of foot processes in rat podocytes / K. Ichimura, H. Kurihara, T. Sakai // *J. Histochem. Cytochem.* – 2003. – Vol. 51, N 12. – P. 1589–1600.

149. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury / J. Mishra, Q. Ma, A. Prada [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – Vol. 14, N 10. – P. 2534–2543.

150. Impact of oxygen status on 10B-BPA uptake into human glioblastoma cells, referring to significance in boron neutron capture therapy / Y. Wada, K. Hirose, T. Harada [et al.] // *J. Radiat. Res.* – 2018. – Vol. 59, N 2. – P. 122–128.

151. In vitro and in vivo evaluation of fluorescently labeled borocaptate-containing liposomes / V. Kanygin, A. Zaboronok, I. Taskaeva [et al.] // *J. Fluoresc.* – 2021. – Vol. 31. – P. 73–83.

152. In vivo (19)F MRI and (19)F MRS of (19)F-labelled boronophenylalanine-fructose complex on a C6 rat glioma model to optimize boron neutron capture therapy (BNCT) / P. Porcari, S. Capuani, E. D'Amore [et al.] // *Phys. Med. Biol.* – 2008. – Vol. 53, N 23. – P. 6979–6989.

153. Inflammation in kidney repair: Mechanism and therapeutic potential / Y. Fu, Y. Xiang, H. Li [et al.] // *Pharmacol. Ther.* – 2022. – Vol. 237. – P. 108240.

154. Inhibition of specific adenylyl cyclase isoforms by lithium and carbamazepine, but not valproate, may be related to their antidepressant effect / L. Mann, E. Heldman, Y. Bersudsky [et al.] // *Bipolar Disord.* – 2009. – Vol. 11, N 8. – P. 885–896.

155. Insights into the use of gadolinium and gadolinium/boron-based agents in imaging-guided neutron capture therapy applications / A. Deagostino, N. Protti, D. Alberti [et al.] // *Future Med. Chem.* – 2016. – Vol. 8, N 8. – P. 899–917.

156. Investigation of irradiation conditions for recurrent breast cancer in JRR-4 / H. Horiguchi, T. Nakamura, H. Kumada [et al.] // *Appl. Radiat. Isot.* – 2011. – Vol. 69, N 12. – P. 1882–1884.

157. Ionizing radiation results in a mixture of cellular outcomes including mitotic catastrophe, senescence, methuosis, and iron-dependent cell death / S. Adjemian, T. Oltean, S. Martens [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2020. – Vol. 11, N 11. – P. 1003.

158. ISNCT : сайт. URL: <https://isnct.net/blog/2023/03/08/newsletter-19/> (date of access: 14.03.2024). – Яз. англ. – Text : electronic.

159. Jenkins, R. W. Treatment of advanced melanoma in 2020 and beyond / R. W. Jenkins, D. E. Fisher // *J. Invest. Dermatol.* – 2021. – Vol. 141, N 1. – P. 23–31.

160. Kakhki, S. Experimental data on lithium salts: From neuroprotection to multi-organ complications / S. Kakhki, S. M. Ahmadi-Soleimani. – DOI 10.1016/j.lfs.2022.120811. – Text : electronic // *Life Sci.* – 2022. – Vol. 306. – P. 120811. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35850248/> (date of access: 21.05.2024).

161. Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury / P. L. Zhang, L. I. Rothblum, W. K. Han [et al.] // *Kidney Int.* – 2008. – Vol. 73, N 5. – P. 608–614.

162. Kidney injury molecule-1 expression predicts structural damage and outcome in histological acute tubular injury / J. Cai, X. Jiao, W. Luo [et al.] // *Ren. Fail.* – 2019. – Vol. 41, N 1. – P. 80–87.

163. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells / T. Ichimura, E. J. Asseldonk, B. D. Humphreys [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118, N 5. – P. 1657–1668.

164. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury / T. Ichimura, C. C. Hung, S. A. Yang [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2004. – Vol. 286, N 3. – P. 552–563.

165. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney / L. Yang, C. R. Brooks, S. Xiao [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2015. – Vol. 125, N 4. – P. 1620–1636.

166. Kretzler, M. Regulation of adhesive interaction between podocytes and glomerular basement membrane / M. Kretzler // *Microsc. Res. Tech.* – 2002. – Vol. 57, N 4. – P. 247–253.

167. Kruger, P. G. Some biological effects of nuclear disintegration products on neoplastic tissue / P. G. Kruger // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1940. – Vol. 26. – P. 181–192.

168. Lameire, N. H. Heterogeneity of nephron function / N. H. Lameire, M. D. Lifschitz, J. H. Stein // *Annuo Revuo Physiol.* – 1977. – Vol. 39. – P. 159–184.

169. Lazarus, J. H. Lithium and thyroid / J. H. Lazarus // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 23, N 6. – P. 723–733.

170. L-boronophenylalanine-mediated boron neutron capture therapy for malignant glioma progressing after external beam radiation therapy: a Phase I study / L. Kankaanranta, T. Seppälä, H. Koivunoro [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2011. – Vol. 80, N 2. – P. 369–376.

171. Li, Y. Hypoxia and the Tumor Microenvironment / Y. Li, L. Zhao, X. F. Li // *Technol. Cancer Res. Treat.* – 2021. – Vol. 20. – N 15330338211036304.

172. Lithium Biological Action Mechanisms after Ischemic Stroke / C. Munteanu, M. Rotariu, M. Turnea [et al.] // *Life (Basel)*. – 2022. – Vol. 12, N 11. – P. 1680.

173. Lithium Enhances Autophagy and Cell Death in Skin Melanoma: An Ultrastructural and Immunohistochemical Study / I. Taskaeva, I. Gogaeva, A. Shatruck, N. Bgatova // *Microsc. Microanal.* – 2022. – Vol. 20. – P. 1–9.

174. Lithium in cancer therapy: friend or foe? / C. Yang, B. Zhu, M. Zhan, Z. C. Hua // *Cancers (Basel)*. – 2023. – Vol. 15. – P. 1095.

175. Lithium nephrotoxicity / A. N. Azab, A. Shnaider, Y. Osher [et al.] // *Int. J. Bipolar Disord.* – 2015. – Vol. 3, N 1. – P. 28.

176. Lithium Poisoning / J. Baird-Gunning, T. Lea-Henry, L. C. G. Hoegberg [et al.] // *Eur. J. Intensive Care Med.* – 2017. – Vol. 32, N 4. – P. 249–263.

177. Lithium toxicity and the kidney with special focus on nephrotic syndrome associated with the acute kidney injury: A case-based systematic analysis / E. Łukawska, D. Frankiewicz, M. Izak [et al.] // *J. Appl. Toxicol.* – 2021. – Vol. 41, N 12. – P. 1896–1909.

178. Lithium: a promising anticancer agent / E. Y. Villegas-Vázquez, L. I. Quintas-Granados, H. Cortés [et al.] // *Life (Basel)*. – 2023. – Vol. 13. – P. 537.

179. Lithium: a review of pharmacology, clinical uses, and toxicity / R. Oruch, M. A. Elderbi, H. A. Khattab [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 740. – P. 464–473.

180. Locher, G. L. Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons / G. L. Locher // *Am. J. Roentgenol. Radium Ther.* – 1936. – Vol. 36, N 1. – P. 1–13.

181. Long-term effect of lithium maintenance therapy on estimated glomerular filtration rate in patients with affective disorders: a population-based cohort study / S. Clos, P. Rauchhaus, A. Severn [et al.] // *Lancet Psychiatry*. – 2015. – Vol. 2. – P. 1075–1083.

182. Long-term outcome of cutaneous melanoma patients treated with boron neutron capture therapy (BNCT) / J. Hiratsuka, N. Kamitani, R. Tanaka [et al.] // *J. Radiat. Res.* – 2020. – Vol. 61, N 6. – P. 945–951.

183. Luessenhop, A. J. Possible use of the neutron capturing isotope lithium in the radiation therapy of brain tumors / A. J. Luessenhop, W. H. Sweet, J. Robinson // *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* – 1956. – Vol. 76, N 2. – P. 376–392.

184. Macro- and microdistributions of boron drug for boron neutron capture therapy in an animal model / Y. C. Lin, J. J. Hwang, S. J. Wang [et al.] // *Anticancer Res.* – 2012. – Vol. 32, N 7. – P. 2657–2664.

185. Maintenance lithium treatment: side effects and compliance / M. J. Gitlin, S. D. Cochran, K R. Jamison [et al.] // *J. Clin. Psychiatry*. – 1989. – Vol. 50, N 4. – P. 127–131.

186. Marakala, V. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in kidney injury – A systematic review / V. Marakala. – DOI 10.1016/j.cca.2022.08.029. – Text : electronic // *Clin. Chim. Acta.* – 2022. – Vol. 536. – P. 135–141. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36150522/> (date of access: 21.05.2024).

187. Mesangial cell: A hub in lupus nephritis / M. Liu, L. Zhang, Y. Wang [et al.] // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – N 1063497.

188. Mesangial cells and glomerular inflammation: from the pathogenesis to novel therapeutic approaches / C. Gómez-Guerrero, P. Hernández-Vargas, O. López-Franco [et al.] // *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*. – 2005. – Vol. 4, N 3. – P. 341–351.

189. Mesangial cells initiate compensatory tubular cell hypertrophy / I. Sinuani, I. Beberashvili, Z. Averbukh [et al.] // *Am. J. Nephrol.* – 2010. – Vol. 31, N 4. – P. 326-31.

190. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by IDH3 α downregulation / D. Zhang, Y. Wang, Z. Shi [et al.] // *Cell Rep.* – 2015. – Vol. 10, N 8. – P. 1335–1348.
191. Metabolite sensing and signaling in cancer / Y. P. Wang, J. T. Li, J. Qu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2020. – Vol. 295, N 33. – P. 11938–11946.
192. Mishima, Y. Melanoma and nonmelanoma neutron capture therapy using gene therapy: overview / Y. Mishima // *Advances in neutron capture therapy* / ed. B. Larsson, J. Crawford, R. Weinreich. – New York : Elsevier, 1997. – P. 10–25.
193. Mitchell, P. B. Lithium treatment for bipolar disorder / P. B. Mitchell, D. Hadzi-Pavlovic // *Bull. World Health Organ.* – 2000. – Vol. 78, N 4. – P. 515–517.
194. Mitchell, P. B. On the 50th anniversary of John Cade's discovery of the anti-manic effect of lithium / P. B. Mitchell // *Aust. N. Z. J. Psychiatry.* – 1999. – Vol. 33, N 5. – P. 623–628.
195. Molecular Markers of Tubulointerstitial Fibrosis and Tubular Cell Damage in Patients with Chronic Kidney Disease / S. Nakagawa, K. Nishihara, H. Miyata [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, N 8. – P. e0136994.
196. Morphometry of the renal corpuscle during normal postnatal growth and compensatory hypertrophy. A light microscope study / G. Olivetti, P. Anversa, W. J. Rigamonti [et al.] // *Cell. Biol.* – 1977. – Vol. 75, N 2, Pt. 1. – P. 573–585.
197. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – Vol. 65, N 1–2. – P. 55–63.
198. Mundel, P. Podocytes and the quest for precision medicines for kidney diseases / P. Mundel // *Pflugers Arch.* – 2017. – Vol. 469, N 7–8. – P. 1029–1037.
199. Nakamura, H. Liposomal boron delivery for neutron capture therapy / H. Nakamura // *Methods Enzymol.* – 2009. – Vol. 465. – P. 179–208.
200. Neoadjuvant treatment for stage III and IV cutaneous melanoma / C. Gorry, L. McCullagh, H. O'Donnell [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2023. – Vol. 1, N 1. – CD012974.

201. Neuropathologic Study of Fourteen Cases of Malignant Brain Tumor Treated by Boron-10 Slow Neutron Capture Radiation / A. K. Asbury, R. G. Ojemann, S. L. Nielsen, W. H. Sweet // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 1972. – Vol. 31, N 2. – P. 278–303.
202. Neurotoxicity in chronic lithium poisoning / P. M. Hlaing, K. Z. Isoardi, C. B. Page, P. Pillans // *Intern. Med. J.* – 2020. – Vol. 50, N 4. – P. 427–432.
203. Neutron capture therapy with boron in the treatment of glioblastoma multiforme / L. E. Farr, W. H. Sweet, J. S. Robertson [et al.] // *Am. J. Roent. Ther. Nucl. Med.* – 1954. – Vol. 71. – P. 279–293.
204. Neutron Capture Therapy: Principles and Applications / W. A. G. Sauerwein, A. Wittig, R. Moss, Y. Nakagawa. – Berlin : Heidelberg Springer-Verlag, 2012. – 543 p.
205. NGAL-Siderocalin in kidney disease / N. Paragas, A. Qiu, M. Hollmen [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1823, N 9. – P. 1451–1458.
206. Nowling, T. K. Mesangial Cells in Lupus Nephritis / T. K. Nowling // *Curr. Rheumatol. Rep.* – 2022. – Vol. 23, N 12. – P. 83.
207. O'Donnell, K. C. The behavioral actions of lithium in rodent models: leads to develop novel therapeutics / K. C. O'Donnell, T. D. Gould // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2007. – Vol. 31. – P. 932–962.
208. On-demand biodegradable boron nitride nanoparticles for treating triple negative breast cancer with boron neutron capture therapy / L. Li, J. Li, Y. Shi [et al.] // *ACS Nano.* – 2019. – Vol. 13. – P. 13843–13852.
209. Pathological study of eight patients with glioblastoma multiforme treated by neutron capture therapy using boron 10 / J. T. Godwin, L. E. Farr, W. H. Sweet, J. S. Robertson // *Cancer.* – 1955. – Vol. 8, N 3. – P. 601–615.
210. Pavenstädt, H. Cell biology of the glomerular podocyte / H. Pavenstädt, W. Kriz, M. Kretzler // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol. 83, N 1. – P. 253–307.
211. Pawlik, T. M. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy / T. M. Pawlik, K. Keyomarsi // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2004. – Vol. 59, N 4. – P. 928–942.

212. Perlewitz A. The juxtaglomerular apparatus / A. Perlewitz, A. E. Persson, A. Patzak // *Acta Physiol. (Oxf)*. – 2012. – Vol. 205, N 1. – P. 6–8.

213. Persson, G. Comparison of plasma lithium levels and their interindividual variations with coated lithium carbonate tablets and a medium-slow-release lithium sulphate preparation (Lithionit Duretter) / G. Persson // *Acta Psychiatr. Scand.* – 1977. – Vol. 55. – P. 147–152.

214. Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene / B. L. Wharram, M. Goyal, J. E. Wiggins [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2005. – Vol. 16, N 10. – P. 2941–2952.

215. Podocyte foot process width is a prediction marker for complete renal response at 6 and 12 months after induction therapy in lupus nephritis / K. Ichinose, M. Kitamura, S. Sato [et al.] // *Clin. Immunol.* – 2018. – Vol. 197. – P. 161–168.

216. Polyborane-encapsulated PEGylated liposomes prepared using post-insertion technique for boron neutron capture therapy / I. Takeuchi, Y. Kanno, H. Uchiro, K. Makino // *J. Oleo Sci.* – 2019. – Vol. 68. – P. 1261–1270.

217. Polymer-Coated Nanoparticles for Therapeutic and Diagnostic Non-10B Enriched Polymer-Coated Boron Carbon Oxynitride (BCNO) Nanoparticles as Potent BNCT Drug / C. W. Chiang, Y. C. Chien, W. J. Yu [et al.]. – DOI 10.3390/nano11112936. – Text : electronic // *Nanomaterials (Basel)*. – 2021. – Vol. 11, N 11. – P. 2936. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34835699/> (date of access: 10.04.2024).

218. Polymer-stabilized elemental boron nanoparticles for boron neutron capture therapy: initial irradiation experiments / A. Zaboronok, P. Khaptakhanova, S. Uspenskii [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – P. 761.

219. Population pharmacokinetic model of lithium and drug compliance assessment / I. Pérez-Castelló, V. Mangas-Sanjuan, I. González-García [et al.] // *Eur. Neuropsychopharmacol.* – 2016. – Vol. 26. – P. 1868–1876.

220. Population Pharmacokinetics and Exposure-Response of Lithium Carbonate in Patients Based on Tubular Reabsorption Mechanisms / D. Yamaguchi,

Y. Tsuji, M. Sonoda [et al.] // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2019. – Vol. 44, N 3. – P. 329–338.

221. Potentialities of High-Resolution 3-D CZT Drift Strip Detectors for Prompt Gamma-Ray Measurements in BNCT / L. Abbene, F. Principato, A. Buttacavoli [et al.] // *Sensors (Basel)*. – 2022. – Vol. 22, N 4. – P. 1502.

222. Preventive Effects of Lithium Carbonate on Antidepressant-Induced Switch During Depressive Episodes: Chinese Data Analysis / L. Wangqiang, T. Hejian, S. Fengli, J. Weidong // *Altern. Ther. Health Med.* – 2022. – Vol. 28, N 1. – P. 58–64.

223. Radiation Therapy for Local Cutaneous Melanoma / P. J. Dabestani, A. J. Dawson, M. W. Neumeister, C. M. Bradbury. – DOI 10.1016/j.cps.2021.05.008. – Text : electronic // *Clin. Plast. Surg.* – 2021. – Vol. 48, N 4. – P. 643–649. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34503724/> (date of access: 10.04.2024).

224. Radiologic findings in patients treated with boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme within EORTC trial 11961 / M. J. Vos, B. Turowski, F. E. Zanella [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2005. – Vol. 61, N 2. – P. 392–399.

225. Rakofsky, J. J. Lithium in the treatment of acute bipolar depression: A systematic review and meta-analysis / J. J. Rakofsky, M. J. Lucido, B. W. Dunlop // *J. Affect. Disord.* – 2022. – Vol. 308. – P. 268–280.

226. Reasons for lithium discontinuation in men and women with bipolar disorder: a retrospective cohort study / L. Öhlund, M. Ott, S. Oja [et al.] // *BMC Psychiatry*. – 2018. – Vol. 18, N 1. – P. 37.

227. Recent advances in the synthesis of high boron-loaded nucleic acids for BNCT / D. S. Novopashina, M. A. Vorobyeva, A. Venyaminova [et al.] // *Front. Chem.* – 2021. – Vol. 9. – P. 619052.

228. Recent progress in the syntheses and biological evaluation of boronated porphyrins for boron neutron-capture therapy / M. W. Renner, M. Miura, M. W. Easson [et al.] // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2006. – Vol. 6. – P. 145–157.

229. Reiser, G. Transport pathways for lithium ions in neuroblastoma x glioma hybrid cells at 'therapeutic' concentrations of Li⁺ / G. Reiser, J. Duhm // *Brain Res.* – 1982. – Vol. 252, N 2. – P. 247–258.
230. Reiser, J. Podocytes / J. Reiser, M. M. Altintas // *Am. J. Pathol.* – 2019. – Vol. 189, N 2. – P. 226–228.
231. Remarkable boron delivery of iRGD-modified polymeric nanoparticles for boron neutron capture therapy / J. Chen, Q. Yang, M. Liu [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2019. – Vol. 14. – P. 8161–8177.
232. Renal failure occurs in chronic lithium treatment but is uncommon / H. Bendz, S. Schön, P. O. Attman, M. Aurell // *Kidney Int.* – 2010. – Vol. 77, N 3. – P. 219–224.
233. Renal function during long-term lithium treatment: a cross-sectional and longitudinal study / A. Bocchetta, R. Arda, T. Fanni [et al.] // *BMC Med.* – 2015. – Vol. 13. – P. 12.
234. Renal histopathology of prolonged acute kidney injury in HELLP syndrome: a case series and literature review / W. Ye, H. Shu, Y. Wen [et al.] // *Int. Urol. Nephrol.* – 2019. – Vol. 51, N 6. – P. 987–994.
235. Rendina, L. M. Can lithium salts herald a new era for neutron capture therapy? / L. M. Rendina // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53, N 23. – P. 8224–8227.
236. Review of Planned, Ongoing Clinical Studies and Recent Development of BNCT in Mainland of China / Z. Zhang, Y. Chong, Y. Liu [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2023. – Vol. 15, N 16. – P. 4060.
237. Roberts, D. M. Pharmacokinetic considerations in clinical toxicology: clinical applications / D. M. Roberts, N. A. Buckley // *Clin. Pharmacokinet.* – 2007. – Vol. 46, N 11. – P. 897–939.
238. Role of p53 mutation in the effect of boron neutron capture therapy on oral squamous cell carcinoma / Y. Fujita, I. Kato, S. Iwai [et al.] // *Radiat. Oncol.* – 2009. – Vol. 11, N 4. – P. 63.

239. Romejko, K. The Review of Current Knowledge on Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) / K. Romejko, M. Markowska, S. Niemczyk // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, N 13. – P. 10470.
240. Ronco, C. Acute kidney injury / C. Ronco, R. Bellomo, J. A. Kellum // *Lancet.* – 2019. – Vol. 394 (10212). – P. 1949–1964.
241. The Pharmacokinetics of lithium for mood disorders / G. S. Malhi, D. Bassett, P. Boyce [et al.] // *Aust. N. Z. J. Psychiatry.* – 2015. – Vol. 49, N 12. – P. 1087–1206.
242. Saneto, R. P. Differences in the accumulation of lithium in human neuroblastoma and glioma cells in tissue culture / R. P. Saneto, J. R. Perez-Polo // *J. Neurosci. Res.* – 1982. – Vol. 7, N 4. – P. 413–418.
243. Sauerwein, W. A. G. Overview of Boron Neutron Capture Therapy in 2022 / W. A. G. Sauerwein, M. Ulčar // *Cancer Biother. Radiopharm.* – 2023. – Vol. 38, N 3. – P. 143–147.
244. Scheemaeker, S. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker for acute kidney injury in dogs / S. Scheemaeker, E. Meyer, J. P. Schoeman // *Vet. J.* – 2020. – Vol. 255. – N 105423.
245. Schrier, R. W. Acute renal failure and sepsis / R. W. Schrier, W. Wang // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 351, N 2. – P. 159–169.
246. Selective delivery of boron by the melanin precursor analogue p-boronophenylalanine to tumors other than melanoma / J. A. Coderre, J. D. Glass, R. G. Fairchild [et al.] // *Cancer Res.* – 1990. – Vol. 50, N 1. – P. 138–141.
247. Selective targeting of boronophenylalanine to melanoma in BALB/c mice for neutron capture therapy / J. A. Coderre, J. D. Glass, R. G. Fairchild [et al.] // *Cancer Res.* – 1987. – Vol. 47, N 23. – P. 6377–6383.
248. Selective thermal neutron capture therapy and diagnosis of malignant melanoma: from basic studies to first clinical treatment / Y. Mishima, M. Ichihashi, S. Hatta [et al.] // *Basic Life Sci.* – 1989. – Vol. 50. – P. 251–260.

249. Selective uptake of boronophenylalanine by glioma stem/progenitor cells / T. Sun, Y. Zhou, X. Xie [et al.] // *Appl. Radiat. Isot.* – 2012. – Vol. 70, N 8. – P. 1512–1518.
250. Self-assembling A6K peptide nanotubes as a mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) delivery system for boron neutron capture therapy (BNCT) / H. Michiue, M. Kitamatsu, A. Fukunaga [et al.] // *J. Control. Release.* – 2021. – Vol. 330. – P. 788–796.
251. Sequeira-Lopez, M. L. S. Renin Cells, the Kidney, and Hypertension / M. L. S. Sequeira-Lopez, R. A. Gomez // *Circ. Res.* – 2021. – Vol. 128, N 7. – P. 887-907.
252. Serum lithium levels and psychosocial function in patients with bipolar I disorder / D. A. Solomon, W. R. Ristow, M. B. Keller [et al.] // *Am. J. Psychiatry.* – 1996. – Vol. 153, N 10. – P. 1301–1307.
253. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration / V. Bailly, Z. Zhang, W. Meier [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, N 42. – P. 39739–39748.
254. Shorter, E. The history of lithium therapy / E. Shorter // *Bipolar Disord.* – 2009. – Vol. 11, Suppl. 2. – P. 4–9.
255. Simultaneous induction of dispersed and clustered DNA lesions compromises DNA damage response in human peripheral blood lymphocytes / L. Cheng, B. Brzozowska, A. Sollazzo [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13, N 10. – P. e0204068.
256. Smeets, B. Parietal epithelial cells and podocytes in glomerular diseases / B. Smeets, M. J. Moeller // *Semin. Nephrol.* – 2012. – Vol. 32, N 4. – P. 357–367.
257. Smoyer, W. E. Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome / W. E. Smoyer, P. Mundel // *J. Mol. Med. (Berl).* – 1998. – Vol. 76, N 3–4. – P. 172–183.
258. Snyder, H. R. Synthesis of Aromatic Boronic Acids. Aldehyde Boronic Acids and a Boronic Acid Analog of Tyrosine1 / H. R. Snyder, A. J. Reedy, W. J. Lennarz // *J. Am. Chem. Soc.* – 1958. – Vol. 80, N 4. – P. 835–838.

259. Stability of 10B-L-boronophenylalanine-fructose injection / C. M. van Rij, A. Sinjewel, A. C. van Loenen [et al.] // *Am. J. Health. Syst. Pharm.* – 2005. – Vol. 62, N 24. – P. 2608–2626.

260. Survival benefit from boron neutron capture therapy for the newly diagnosed glioblastoma patients / S. Kawabata, S. Miyatake, N. Nonoguchi [et al.] // *Appl. Radiat. Isot.* – 2009. – Vol. 67, Suppl. 7–8. – P. 15–18.

261. Suzuki, M. Boron neutron capture therapy (BNCT): a unique role in radiotherapy with a view to entering the accelerator-based BNCT era / M. Suzuki // *Int. J. Clin. Oncol.* – 2020. – Vol. 25, N 1. – P. 43–50.

262. Takeuchi, I. Chitosan Coating Effect on Cellular Uptake of PLGA Nanoparticles for Boron Neutron Capture Therapy / I. Takeuchi, M. Ariyama, K. Makino // *J. Oleo Sci.* – 2019. – Vol. 68, N 4. – P. 361–368.

263. Tamat, S. R. Determination of the concentration of complex boronated compounds in biological tissues by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry / S. R. Tamat, D. E. Moore, B. J. Allen // *Pigment Cell Res.* – 1989. – Vol. 2, N 4. – P. 281–285.

264. Targeting the recruitment of monocytes and macrophages in renal disease / V. Vielhauer, O. Kulkarni, C. A. Reichel, H. J. Anders // *Semin. Nephrol.* – 2010. – Vol. 30, N 3. – P. 318–333.

265. Taylor, H. J. Detection of nuclear disintegration in a photographic emulsion / H. J. Taylor, M. Goldhaber // *Nature (London)*. – 1935. – Vol. 135. – P. 341–348.

266. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide / F. Bray, M. Laversanne, E. Weiderpass, I. Soerjomataram. – DOI 10.1002/cncr.33587. – Text : electronic // *Cancer*. – 2021. – Vol. 127, N 16. – P. 3029–3030. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34086348/> (date of access: 10.04.2024).

267. The Mesangial cell – the glomerular stromal cell / S. Avraham, B. Korin, J. J. Chung [et al.]. – DOI 10.1038/s41581-021-00474-8. – Text : electronic // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2021. – Vol. 17, N 12. – P. 855–864. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34508249/> (date of access: 10.04.2024).

268. The more modelling and basic characteristics of the heavy water neutron irradiation facility of the Kyoto University research reactor mainly for neutron capture therapy / T. Kobayashi, Y. Sakurai, K. Kanda [et al.] // Nucl. Technol. – 2002. – Vol. 131. – P. 354–378.

269. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition / D. H. Goetz, M. A. Holmes, N. Borregaard [et al.] // Mol. Cell. – 2002. – Vol. 10, N 5. – P. 1033–1043.

270. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL / L. Cai, J. Rubin, W. Han [et al.] // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. – 2010. – Vol. 5, N 12. – P. 2229–2235.

271. The Pharmacokinetics of lithium / C. Couffignal, L. Chevillard, S. El Balkhi [et al.] // In The science and practice of lithium therapy / eds. G. S. Malhi, M. Masson, F. Bellivier. – Berne : Springer Cham. – 2017. – P. 25–53.

272. The role of podocytes in proteinuria / K. Asanuma, E. Yanagida-Asanuma, M. Takagi [et al.] // Nephrology (Carlton). – 2007. – Vol. 12, Suppl 3. – P. 15–20.

273. The state of the art of bispecific antibodies for treating human malignancies / S. Wang, K. Chen, Q. Lei [et al.] // EMBO Mol. Med. – 2021. – Vol. 13, N 9.

274. The syntheses and in vivo biodistribution of novel boronated unnatural amino acids / G. W. Kabalka, Z. Z. Wu, M-L. Yao [et al.] // Appl. Radiat. Isot. – 2004. – Vol. 61, N 15. – P. 1111–1115.

275. The treatment of Advanced Melanoma: Current approaches and new challenges / A. Boutros, E. Croce, M. Ferrari [et al.] // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2024. – Vol. 196. – P. 104276.

276. The unique structural and functional characteristics of glomerular endothelial cell fenestrations and their potential as a therapeutic target in kidney disease / N. C. Finch, C. R. Neal, G. I. Welsh [et al.]. – DOI 10.1152/ajprenal.00036.2023. – Text : electronic // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2023. – Vol. 325, N 4. – P. F465–F478. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37471420/> (date of access: 21.05.2024).

277. Theranostics in boron neutron capture therapy / W. A. G. Sauerwein, L. Sancey, E. Hey-Hawkins [et al.] // *Life* (Basel). – 2021. – Vol. 11. – P. 330.

278. Therapeutic success of boron neutron capture therapy (BNCT) mediated by a chemically non-selective boron agent in an experimental model of oral cancer: a new paradigm in BNCT radiobiology / V. A. Trivillin, E. M. Heber, D. W. Nigg [et al.] // *Radiat. Res.* – 2006. – Vol. 166, N 2. – P. 387–396.

279. Three-dimensional ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx under normal and experimental endotoxemic conditions / H. Okada, G. Takemura, K. Suzuki [et al.] // *Crit. Care.* – 2017. – Vol. 21, N 1. – P. 261.

280. Tracing Boron with Fluorescence and Positron Emission Tomography Imaging of Boronated Porphyrin Nanocomplex for Imaging-Guided Boron Neutron Capture Therapy / Y. Shi, J. Li, Z. Zhang [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2018. – Vol. 10, N 50. – P. 43387–43395.

281. Treatment for Lithium Poisoning: Systematic Review and Recommendations from the EXTRIP Workgroup / B. S. Decker, D. S. Goldfarb, P. I. Dargan [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2015. – Vol. 10, N 5. – P. 875–887.

282. Treatment of lithium intoxication: facing the need for evidence / R. Haussmann, M. Bauer, S. von Bonin [et al.] // *Int. J. Bipolar Disord.* – 2015. – Vol. 3, N 1. – P. 23.

283. Treatment of malignant melanoma by single thermal neutron capture therapy with melanoma-seeking 10B-compound / Y. Mishima, C. Honda, M. Ichihashi [et al.] // *Lancet.* – 1989. – Vol. 2 (8659). – P. 388–389.

284. Tridimensional ultrastructure of glomerular capillary endothelium revealed by high-resolution scanning electron microscopy / P. J. Lea, M. Silverman, R. Hegele, M. J. Hollenberg // *Microvasc. Res.* – 1989. – Vol. 38, N 3. – P. 296–308.

285. Tumor cell-specific 2'-fluoro RNA aptamer conjugated with closododecaborate as a potential agent for boron neutron capture therapy / M. A. Vorobyeva, M. A. Dymova, D. S. Novopashina [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, N 14. – P. 7326.

286. Tumor-specific targeting of sodium borocaptate (BSH) to malignant glioma by transferrin-PEG liposomes: a modality for boron neutron capture therapy / A. Doi, S. Kawabata, K. Iida [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2008. – Vol. 87, N 3. – P. 287–294.

287. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as an early marker of acute kidney injury in critically ill multiple trauma patients / K. Makris, N. Markou, E. Evodia [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2009. – Vol. 47, N 1. – P. 79–82.

288. Vallon, V. Targeting renal glucose reabsorption to treat hyperglycaemia: the pleiotropic effects of SGLT2 inhibition / V. Vallon, S. C. Thomson // *Diabetologia.* – 2017. – Vol. 60, N 2. – P. 215-225.

289. Vosahlikova, M. Lithium – therapeutic tool endowed with multiple beneficiary effects caused by multiple mechanisms / M. Vosahlikova, P. Svoboda // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* – 2016. – Vol. 76. – P. 1–19.

290. Wen, Y. Current concepts and advances in biomarkers of acute kidney injury / Y. Wen, C. R. Parikh // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 2021. – Vol. 58, N 5. – P. 354–368.

291. What is the optimal serum level for lithium in the maintenance treatment of bipolar disorder? A systematic review and recommendations from the ISBD/IGSLI Task Force on treatment with lithium / W. A. Nolen, R. W. Licht, A. H. Young [et al.] // *Bipolar Disord.* – 2019. – Vol. 21, N 5. – P. 394–409.

292. Winstead, E. Can mRNA vaccines help treat cancer? / E. Winstead, K. Breckpot // National Cancer Institute : [website]. – 2022. – URL : <https://researchportal.vub.be> (date of access: 14.03.2024). – Text : electronic.

293. Won, E. An Oldie but Goodie: Lithium in the Treatment of Bipolar Disorder through Neuroprotective and Neurotrophic Mechanisms / E. Won, Y. K. Kim // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, N 12. – P. 2679.

294. Yoshimura, Y. Podocyte development, disease, and stem cell research / Y. Yoshimura, R. Nishinakamura // *Kidney Int.* – 2019. – Vol. 96, N 5. – P. 1077–1082.

295. Zahl, P. Localization of lithium in tumor tissue as a basis for slow neutron therapy / P. Zahl, F. Cooper // *Science.* – 1941. – Vol. 93. – P. 64–65.

296. Zhang, P. L. Kidney injury molecule-1, a sensitive and specific marker for identifying acute proximal tubular injury, can be used to predict renal functional recovery in native renal biopsies / P. L. Zhang // *Int. Urol. Nephrol.* – 2019. – Vol. 51, N 12. – P. 2255–2265.

297. Zhao, J. H. Mesangial Cells and Renal Fibrosis / J. H. Zhao // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2019. – Vol. 1165. – P. 165–194.

298. Zhuo, J. L. Proximal nephron / J. L. Zhuo, X. C. Li // *Compr. Physiol.* – 2013. – Vol. 3, N 3. – P. 1079–1123.

299. Zou, C. Advances in the study of subclinical AKI biomarkers / C. Zou, C. Wang, L. Lu // *Front Physiol.* – 2022. – Vol. 13. – N 960059.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Схема бор-нейтронозахватной реакции (Таскаев С.Ю., 2019 [18]) С. 14
2. Рисунок 2 – Схема литий-нейтронозахватной реакции. С. 24
3. Рисунок 3 – Схема строения нефрона (Zhuo J. L., 2013 [298]). С. 26
4. Рисунок 4 – Схема строения фильтрационного барьера почки (Daehn I.S., 2021 [101]) С. 28
5. Рисунок 5 – Морфология клеточных культур VJ-5ta, SK-Mel-28 и V16. Увеличение × 100 (верхняя панель), × 400 (нижняя панель). . . С. 51
6. Рисунок 6 – Цитотоксичность борсодержащих препаратов борфенилаланина и боркаптата в различных концентрациях бора для клеточных культур VJ-5ta, SK-Mel-28 и V16, МТТ-тест. С. 52
7. Рисунок 7 – Анализ концентрации бора в клетках VJ-5ta, SK-Mel-28 и V16 через 24 часа инкубации с борсодержащими препаратами. . . . С. 53
8. Рисунок 8 – Цитотоксичность солей лития в различных концентрациях лития для клеточных культур VJ-5ta, SK-Mel-28 и V16, МТТ-тест. С. 55
9. Рисунок 9 – Оценка колониеобразующей способности клеточных культур VJ-5ta, SK-Mel-28 и V16 через 8–12 суток после инкубации с солями лития, клоногенный тест. Лунки после окрашивания красителем Гимза (А), сформированные клеточные колонии, окраска клеток с помощью красителя Гимза, увеличение × 100 (Б), результат клоногенного теста – процент выживших клеток, образовавших колонии, относительно контрольной группы (В). . . . С. 56
10. Рисунок 10 – Анализ концентрации лития в клетках VJ-5ta, SK-Mel-28 и V16 через 24 часа инкубации с солями лития. С. 57
11. Рисунок 11 – Результаты исследования биораспределения лития в опухоли, коже, крови, почках и головном мозге (А, Б) и

- соотношение концентраций лития опухоль/кожа и опухоль/кровь (В, Г) в динамике после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) (А, В) и 400 мг/кг (ЛК-400) (Б, Г) мышам с имплантированной меланомой В16. С. 59
12. Рисунок 12 – Вес тела мышей с В16 меланомой после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300, А) и 400 мг/кг (ЛК-400, Б). С. 61
13. Рисунок 13 – Срезы почки в контрольной группе. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$ С. 62
14. Рисунок 14 – Срезы почки через 15 мин. после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (А), увеличение $\times 100$ и 400 мг/кг (Б), увеличение $\times 200$. Окраска гематоксилином и эозином. С. 63
15. Рисунок 15 – Срезы почки через 30 мин. после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (А) и 400 мг/кг (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$ С. 64
16. Рисунок 16 – Срезы почки через 90 мин. после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (А) и 400 мг/кг (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$ С. 65
17. Рисунок 17 – Срезы почки через 180 мин. после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (А) и 400 мг/кг (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$ С. 66
18. Рисунок 18 – Срезы почки через 7 суток после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (А) увеличение $\times 100$ и 400 мг/кг (Б), увеличение $\times 200$. Окраска гематоксилином и эозином. С. 67
19. Рисунок 19 – Микропрепараты ткани почки контрольной группы (А), и через 15 мин., 30 мин., 90 мин., 180 мин. и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) и 400 мг/кг (ЛК-400) (Б) мышам с В16 меланомой. ШИК-реакция.

- Увеличение $\times 100$ С. 69
20. Рисунок 20 – Электронно-микроскопическое исследование почки. Ультраструктура почечного фильтра в контрольной группе (А), и после введения лития карбоната: через 15 мин., доза 300 мг/кг (Б), 30 мин., доза 400 мг/кг (В), 90 мин., доза 300 мг/кг (Г), 180 мин., доза 300 мг/кг (Д) и 7 суток, доза 400 мг/кг (Е). С. 71
21. Рисунок 21 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев в контрольной группе мышей с отдаленным опухолевым ростом. Наличие отека цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных канальцев (А). Набухание апикальной зоны эпителиоцита и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев (Б). Расширение цистерн комплекса Гольджи и наличие вакуолей в цитоплазме (В). Нарушение структуры митохондрий (Г). С. 72
22. Рисунок 22 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 15 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг. Наличие отека цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных канальцев (А). Набухание апикальной зоны эпителиоцита и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев (Б). Митохондрии с со слабо выраженными кристами, наличие вакуолей в околядерной зоне цитоплазме (В). Набухание цитоплазмы в базальной части эпителиоцита (Г). С. 73
23. Рисунок 23 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 15 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг. Наличие отека цитоплазмы части эпителиоционов и присутствие клеток с электронно-плотной цитоплазмой в пределах проксимального канальца (А). Набухание апикальной зоны эпителиоцита и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев (Б). Накопление электронно-плотного

- материала в околядерной зоне цитоплазмы (В). Слабо выраженная базальная исчерченность и набухание цитоплазмы (Г). С. 75
24. Рисунок 24 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 30 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг. Наличие отека цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных канальцев, доза 300 мг/кг (А). Набухание апикальной зоны эпителиоцита и снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев, доза 400 мг/кг (Б). Наличие аутофагосом, снижение содержания мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, накопление электронно-плотного материала в цитоплазме, доза 300 мг/кг (В). Набухание цитоплазмы в базальной части эпителиоцита, доза 400 мг/кг (Г). . . . С. 76
25. Рисунок 25 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 90 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг. Наличие отека цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных канальцев, доза 300 мг/кг (А). Значительное снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев, доза 400 мг/кг (Б). Митохондрии со слабо выраженными кристами, снижение содержания мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума и полисом в цитоплазме, доза 300 мг/кг (В). Слабо выраженная базальная исчерченность в цитоплазме эпителиоцита, доза 400 мг/кг (Г). С. 77
26. Рисунок 26 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 180 минут после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 и 400 мг/кг. Наличие отека цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных канальцев, доза 300 мг/кг (А). Низкое снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев, доза

- 300 мг/кг (Б). Митохондрии со слабо выраженными кристами, наличие зон деструкции в цитоплазме, доза 400 мг/кг (В). Слабо выраженная базальная исчерченность и наличие зон деструкции цитоплазмы, доза 400 мг/кг (Г). С. 78
27. Рисунок 27 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев у мышей с отдаленным опухолевым ростом через 7 суток после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг и 400 мг/кг. Наличие отека-набухания цитоплазмы отдельных эпителиоцитов проксимальных канальцев, доза 300 мг/кг (А). Набухание апикальной зоны эпителиоцита проксимального канальца, доза 400 мг/кг (Б). Митохондрии со слабо выраженными кристами, доза 300 мг/кг (В). Уменьшение базальной исчерченности в цитоплазме эпителиоцита проксимального канальца, доза 400 мг/кг (Г). С. 80
28. Рисунок 28 – Электронно-микроскопическое исследование почки. Ультраструктура эпителиоцитов проксимальных канальцев в контрольной группе (А) и после введения лития карбоната: через 15 мин., доза 300 мг/кг (Б), 30 мин., доза 400 мг/кг (В), 90 мин., доза 300 мг/кг (Г), 180 мин., доза 300 мг/кг (Д) и 7 суток, доза 400 мг/кг (Е). Базальные мембраны эпителиоцитов проксимальных канальцев (звездочки). С. 81
29. Рисунок 29 – Иммуногистохимическое окрашивание срезов почки на маркер острого повреждения почек Kim-1. Контрольная группа (А), через 15, 30, 90, 180 минут и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) и 400 мг/кг (ЛК-400) (Б). Увеличение $\times 400$ С. 85
30. Рисунок 30 – Оценка результатов иммуногистохимического окрашивания срезов почки на маркер острого повреждения почек Kim-1 в контрольной группе и через 15, 30, 90, 180 минут и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг

- (ЛК-300, А) и 400 мг/кг (ЛК-400, Б). С. 86
31. Рисунок 31 – Иммуногистохимическое окрашивание срезов почки на маркер острого повреждения почек NGAL. Контрольная группа (А), через 15, 30, 90, 180 минут и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) и 400 мг/кг (ЛК-400) (Б). Увеличение 10 × 40. С. 87
32. Рисунок 32 – Оценка результатов иммуногистохимического окрашивания срезов почки на маркер острого повреждения почек NGAL в контрольной группе и через 15, 30, 90, 180 минут и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300, А) и 400 мг/кг (ЛК-400, Б). С. 88
33. Таблица 1 – Изотопы с большим сечением захвата теплового нейтрона. С. 23
34. Таблица 2 – Фармакокинетические параметры биораспределения лития после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) и 400 мг/кг (ЛК-400) мышам с имплантированной меланомой В16. С. 60
35. Таблица 3 – Оценка площади окрашивания гликогена (%) почечных канальцев периодической кислотой Шиффа (ШИК-реакция) в контрольной группе и у мышей через 15 мин., 30 мин., 90 мин., 180 мин. и 7 дней после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) и 400 мг/кг (ЛК-400). С. 69
36. Таблица 4 – Результаты морфометрии компонентов фильтрационного барьера и эпителиоцитов проксимальных канальцев почки в контрольной группе и через 15 мин., 30 мин., 90 мин., 180 мин. и 7 суток после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг. С. 82
37. Таблица 5 – Результаты морфометрии компонентов фильтрационного барьера и эпителиоцитов проксимальных канальцев почки в контрольной группе и через 15 мин, 30 мин, 90

мин, 180 мин и 7 суток после однократного перорального введения
лития карбоната в дозе 400 мг/кг. С. 83