

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-006.04+612.085.2

Касатова А.И.<sup>1-3</sup>, Каныгин В.В.<sup>2</sup>, Разумов И.А.<sup>2,4</sup>, Таскаев С.Ю.<sup>2,3</sup>, Касатов Д.А.<sup>2,3</sup>, Бывальцев В.А.<sup>1,5</sup>

## Исследование биологической эффективности бор-нейтронозахватной терапии на клетках глиомы и меланомы человека

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, 664003, г. Иркутск, Россия, ул. Красного Восстания, д. 1;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», 630090, г. Новосибирск, Россия, ул. Пирогова, д. 2;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера» СО РАН, 630090, г. Новосибирск, Россия, проспект академика Лаврентьева, д. 11;

<sup>4</sup>ФГБНУ ФИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН, 630090, г. Новосибирск, Россия, проспект академика Лаврентьева, д. 10;

<sup>5</sup>НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский», 664082, г. Иркутск, Россия, ул. Боткина, д. 10

**Введение.** Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) является перспективной экспериментальной методикой лечения онкологических заболеваний. По данным клинических исследований пациентов с глиобластомой и меланомой, леченных БНЗТ на ядерных реакторах, отмечены рост медианы выживаемости и улучшение качества жизни. Для получения эпителиевых нейтронов ведется разработка новых источников на основе ускорителей заряженных частиц. Один из проектов был реализован в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, достигнутые параметры пучка позволяют проводить доклинические исследования.

**Цель работы** – выявление на клеточных линиях глиомы и меланомы зависимости эффективности БНЗТ от концентрации бора при использовании пучка, генерируемого на источнике эпителиевых нейтронов ускорительного типа Института ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН и оценка перспектив использования этого источника эпителиевых нейтронов для дальнейших клинических исследований.

**Методика.** Клеточные линии U251 (глиома) и SK-Mel28 (меланома) опухолей человека инкубировали с добавлением в ростовую среду различных концентраций бора, используя препарат борфенилаланин, в течение 24 ч, затем облучали потоком нейтронов. Измерение концентрации изотопа бора <sup>10</sup>B в опухолевых клетках проводили на атомно-эмиссионном спектрометре ICPE-9820 (Shimadzu, Япония). Клоногенный тест использовали для оценки влияния бор-нейтронозахватной терапии на клетки глиомы и меланомы.

**Результаты.** Анализ данных БНЗТ показал, что колониеобразующие свойства облученных клеток глиомы и меланомы уменьшались с повышением концентрации бора. Так, по мере накопления бора линией SK-Mel28 увеличивается количество погибших клеток после облучения, а концентрация <sup>10</sup>B 25 мкг/мл обеспечивает летальную дозу для 100% клеток (LD100). Глиальная линия накапливает бор менее интенсивно и гибель 100% клеток происходит при концентрации <sup>10</sup>B 50 мкг/мл. В образцах, облученных без бора, в сравнении с контролем также наблюдалось снижение выживаемости клеток из-за присутствия быстрых нейтронов и гамма-излучения.

**Заключение.** Данные экспериментов *in vitro* доказывают эффективность действия бор-нейтронозахватной терапии на клетки глиомы и меланомы при использовании источника эпителиевых нейтронов ускорительного типа ИЯФ СО РАН и борфенилаланина как агента доставки бора с концентрацией <sup>10</sup>B 6,25-50 мкг/мл, а также перспективность использования данного метода в лечении таких опухолей, как глиома и меланома.

**Ключевые слова:** бор-нейтронозахватная терапия; источник эпителиевых нейтронов; борфенилаланин; клеточные линии; клоногенный тест.

**Для цитирования:** Касатова А.И., Каныгин В.В., Разумов И.А., Таскаев С.Ю., Касатов Д.А., Бывальцев В.А. Исследование биологической эффективности бор-нейтронозахватной терапии на клетках глиомы и меланомы человека *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(3): 110-116.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.110-116

**Для корреспонденции:** Касатова Анна Исмагиловна, e-mail: yarullinaai@yahoo.com

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Каныгин В.В., Бывальцев В.А.; сбор и обработка материала – Разумов И.А., Таскаев С.Ю., Касатова А.И., Касатов Д.А.; статистическая обработка – Касатова А.И., Касатов Д.А.; написание текста – Касатова А.И., Касатов Д.А.; редактирование – Каныгин В.В., Разумов И.А., Таскаев С.Ю., Бывальцев В.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

**Финансирование.** Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ № 19-72-30005 (облучение клеточных культур потоком нейтронов и измерение концентрации изотопа бора на атомно-эмиссионном спектрометре) и гранта РФФИ № 18-29-01007 (закупка сред и расходных материалов для *in vitro* исследований) с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность А.Н. Макарову, И.М. Щудло, Я.А. Колесникову, Е.О. Соколовой, А.М. Кошкареву, Т.А. Быкову за обеспечение генерации нейтронов, Т.В. Сычевой за проведение расчетов поглощенной дозы.

Поступила 30.04.2019

Принята к печати 24.06.2020

Опубликовано 21.08.2020

**Kasatova A.I.<sup>1,3</sup>, Kanygin V.V.<sup>2</sup>, Razumov I.A.<sup>2,4</sup>, Taskaev S.Yu.<sup>2,3</sup>, Kasatov D.A.<sup>2,3</sup>, Byvaltsev V.A.<sup>1,5</sup>**

## Biological effectiveness of boron neutron capture therapy in human glioma and melanoma cells

<sup>1</sup>Irkutsk State Medical University, Krasnogo Vosstaniya Str. 1, Irkutsk 664003, Russia;

<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Pirogova Str. 2, Novosibirsk 630090, Russia;

<sup>3</sup>G.I. Budker Institute of Nuclear Physics, Prospekt Akademika Lavrentieva 11, Novosibirsk 630090, Russia;

<sup>4</sup>Institute of Cytology and Genetics, Prospekt Akademika Lavrentieva 10, Novosibirsk 630090, Russia;

<sup>5</sup>Railway Clinical Hospital on the Irkutsk-Passazhirskiy Station, Botkina Str. 10, Irkutsk 664082, Russia

Boron neutron capture therapy (BNCT) is a promising experimental method for the treatment of oncological diseases. According to results of clinical trials, patients with glioblastoma and melanoma treated with BNCT at nuclear reactors showed an increase in median overall survival and an improvement in quality of life. To obtain epithermal neutrons, new sources based on charged particle accelerators are being developed. One of the projects was implemented at the G.I. Budker Institute of Nuclear Physics, and the obtained beam parameters allowed conducting preclinical experiments.

**The aims** were to identify the dependence of the effectiveness of BNCT in glioma and melanoma cell lines on boron concentrations using a beam generated at the accelerator based epithermal neutron source in the G.I. Budker Institute of Nuclear Physics and to evaluate prospects for using this epithermal neutron source for further clinical research.

**Methods.** The U251 glioma cell line and the SK-Mel28 melanoma cell line were incubated with various concentrations of boronophenylalanine added to the growth medium for 24 hours and then irradiated with a neutron flux. The  $^{10}\text{B}$  accumulation in tumor cells was measured with an ICPE-9820 atomic emission spectrometer (Shimadzu, Japan). The effect of BNCT on glioma and melanoma cells was evaluated by the colony forming assay.

**Results.** Analysis of the BNCT experimental data showed that the colony-forming capabilities of irradiated glioma and melanoma cells decreased in proportion to the increase in boron concentration. Thus, increasing accumulation of boron by SK-Mel 28 cells provided a greater number of dead cells with irradiation at a concentration of  $10^8$  of 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  being a lethal dose for 100% of the cells (LD100). The glial cell line accumulated boron less intensively; death of 100% of cells occurred at a  $10^8$  concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In samples irradiated without boron, the number of colonies was also decreased compared to the control due to the presence of fast neutrons and gamma-radiation components. All differences between the control and the experiment were statistically significant ( $p < 0.05$  for all).

**Conclusion.** The results of the *in vitro* experiments demonstrated the effectiveness of BNCT in glioma and melanoma cell lines with the use of accelerator based epithermal neutron source in BINP and boronophenylalanine as a boron delivery agent at  $10^8$  concentrations of 6.25-50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Furthermore, this method proved promising for the treatment of tumors, such as glioma and melanoma.

**Keywords:** boron neutron capture therapy; accelerator based epithermal neutron source; boronophenylalanine; cell lines; colony forming assay.

**For citation:** Kasatova A.I., Kanygin V.V., Razumov I.A., Taskaev S.Yu., Kasatov D.A., Byvaltsev V.A. Biological effectiveness of boron neutron capture therapy in human glioma and melanoma cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 110-116. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.110-116.

**For correspondence:** Anna I. Kasatova, e-mail: yarullinaai@yahoo.com

**Contribution:** research concept and design – Kanygin V.V., Byvaltsev V.A.; material collecting and processing – Razumov I.A., Taskaev S.Yu., Kasatova A.I., Kasatov D.A.; statistical processing – Kasatova A.I., Kasatov D.A.; writing text – Kasatova A.I., Kasatov D.A.; text editing – Kanygin V.V., Razumov I.A., Taskaev S.Yu., Byvaltsev V.A. Approval of the final version of the article – all co-authors.

**Acknowledgments.** The study was supported by the Russian Science Foundation, grant #19-72-30005 (irradiation of cell cultures with a neutron flux and measurement of the isotope concentration on an atomic emission spectrometer) and the Russian Foundation for Basic Research, grant #18-29-01007 (purchasing media and supplies for *in vitro* studies). The use of equipment at the "Center for Genetic Resources of Laboratory Animals" Core Facility of the Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, was supported by the Ministry of Education and Science of Russia (Project Unique ID: RFMEFI62117X0015).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Gratitude.** The authors thank A.N. Makarov, I.M. Shchudlo, Ya.A. Kolesnikov, E.O. Sokolova, A.M. Koshkarev, and T.A. Bykov for providing neutron generation and T.V. Sycheva for calculation of absorbed doses.

**Information about the authors:**

Kasatova A.I., <https://orcid.org/0000-0002-6641-9344>

Kanygin V.V., <https://orcid.org/0000-0002-9220-8663>

Razumov I.A., <https://orcid.org/0000-0002-6756-1457>

Taskaev S.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5313-2563>

Kasatov D.A., <https://orcid.org/0000-0001-5649-524X>

Byvaltsev V.A., <https://orcid.org/0000-0003-4349-7101>

Received 30.04.2019

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

## Введение

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) — это перспективная экспериментальная методика лечения онкологических заболеваний [1]. Методика основана на эффективном захвате нейтрона ядром изотопа  $^{10}\text{B}$ , в результате чего в 94% случаев образуются высокоэнергетические  $\alpha$ -частица, атомное ядро лития и  $\gamma$ -квант с суммарной энергией 2,79 МэВ. В 6% случаев энергия реакции распределяется только между  $\alpha$ -частицей и атомным ядром лития. Длина пробега частиц составляет от 5 до 10 мк, разрушение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и органелл происходит преимущественно в пределах клетки-мишени, не распространяясь на окружающие здоровые ткани мозга [2]. Лежащая в основе бор-нейтронозахватной терапии локальная ядерная реакция не имеет аналогов по селективности воздействия на клеточные структуры.

Глиома и меланома человека представляют собой наиболее распространенные злокачественные новообразования с низким значением медианы выживаемости пациентов. Эти опухоли агрессивны, склонны к рецидиву и плохо поддаются лечению по стандартным протоколам. Применение БНЗТ у таких больных продемонстрировало обнадеживающие результаты. По данным клинических исследований, осуществленных проф. Т. Ямомото в Японии на реакторе JRR-4, после БНЗТ у пациентов с глиобластомой отмечены рост медианы выживаемости и улучшение качества жизни [3]. В университете Кобэ этим методом пролечено 24 пациента с различными гистологическими типами меланом. При этом локальный контроль над опухолью достигнут в 60% случаев, а общая 5-летняя выживаемость составила 75% при первичных меланомах [4]. Подавляющее большинство клинических работ по БНЗТ было проведено на ядерных реакторах. Однако их использование влечет за собой высокую стоимость исследования, невозможность проведения работ в общеклинических условиях, а также имеет потенциальную опасность радиационной

катастрофы. В настоящее время клинические исследования в области БНЗТ в большинстве стран приостановлены. Альтернативным направлением получения эпитепловых нейтронов с характеристиками, позволяющими их использовать в клинике, является создание источников на основе ускорителей заряженных частиц. Они компактны, допустимо их размещение на территории лечебных центров, их эксплуатация дешевле и безопаснее, а главное — физические характеристики генерируемого пучка нейтронов оптимизированы для проведения БНЗТ. Источник эпитепловых нейтронов ускорительного типа сконструирован в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН (ИЯФ СО РАН) [5]. Достигнутые к настоящему времени параметры пучка позволяют проводить доклинические исследования [6]. Вместе с тем работы по увеличению тока протонного пучка [7, 8] и обеспечению стабильной генерации эпитепловых нейтронов на источнике продолжаются [9, 10].

Цель исследования — выявление зависимости эффективного проведения БНЗТ на клеточных линиях глиомы и меланомы от концентрации бора при использовании пучка, генерируемого на источнике эпитепловых нейтронов ускорительного типа ИЯФ СО РАН и оценка перспектив использования этого источника эпитепловых нейтронов для дальнейших клинических исследований.

В этой связи после проведения БНЗТ оценивали зависимость выживаемости клеток линий U251 и SK-Mel28 от накопления в них  $^{10}\text{B}$ . Указанные клеточные линии глиомы и меланомы человека были выбраны потому, что пациенты с одноименными опухолями прошли успешное лечение методом БНЗТ на реакторах [11–13]. Так, БНЗТ, проведенная на японском реакторе JRR-4, увеличила среднюю продолжительность жизни пациентов до 25,7 мес (18 мес для стандартной терапии), а 2-летняя выживаемость составила 45,5% [11].

### Методика

В исследовании использовали клеточные линии меланомы человека: U251 – глиома (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) и SK-Mel28 – меланома (ЦКП Центр генетических ресурсов лабораторных животных, SPF-виварий, ИЦИГ СО РАН, Новосибирск). Клетки культивировали на среде EMEM (Sigma, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки пересеивали, используя раствор трипсин-версена 2-3 раза в неделю в соотношении 1:3 – 1:5.

В качестве агента адресной доставки бора использовали борфенилаланин (БФА), обогащенный изотопом <sup>10</sup>B (более 99,5% <sup>10</sup>B, Katchem, Чехия). Для приготовления раствора борфенилаланина применяли фруктозу в молярном избытке (БФА-Ф) [14]. Концентрация раствора изотопа <sup>10</sup>B составляла 1,5 мг/мл. Ранее было показано, что максимальное накопление бора клетками происходит через 24 ч с начала инкубации с борфенилаланином [16], поэтому в данном исследовании этот период инкубации выбран как оптимальный.

Клеточные линии инкубировали в культуральных флаконах (Jet Biofil, Китай, площадь ростовой поверхности 25 см<sup>2</sup>), по 3 флакона на каждую группу в течение 24 ч, в логарифмической фазе роста среду заменяли на среду, содержащую <sup>10</sup>B. Концентрация <sup>10</sup>B в среде составила в различных экспериментальных группах 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл. Клетки с препаратом, содержащим <sup>10</sup>B, инкубировали в течение 24 ч (контрольные образцы культивировали без препарата бора). Затем все группы клеток снимали трипсином, центрифугировали и переносили в среде без бора в объеме 1,5 мл в полипропиленовые криопробирки [15] для удобства расположения в фантоме.

Облучение проводили на ускорительном источнике эпитепловых нейтронов в ИЯФ СО РАН [6], обеспечивающем поток нейтронов в оптимальном для БНЗТ энергетическом диапазоне (от 1 до 30 кэВ [5]) с плотностью  $3 \times 10^8 \text{ см}^{-2} \text{ с}^{-1}$ . Вклад гамма-излучения в поглощенную дозу зависит от концентрации бора: от 70% при отсутствии бора в клетках до 10% при концентрации <sup>10</sup>B 50 мкг/мл. Облучение проводили, как было описано ранее [16].

Расчеты показывают, что при токе протонов и при концентрации <sup>10</sup>B 50 мкг/мл мощность поглощенной дозы составляет 9,6 Гр (ОБЭ), при этом вклад дозы продуктов реакции <sup>10</sup>B(n, α)<sup>7</sup>Li составляет 85%. При концентрации бора 25 мкг/мл мощность дозы равна 5,7 Гр (ОБЭ) (вклад дозы продуктов реакции <sup>10</sup>B(n, α)<sup>7</sup>Li – 70%), при 12,5 мкг/мл – 3,7 Гр (ОБЭ) (вклад дозы продуктов реакции <sup>10</sup>B(n, α)<sup>7</sup>Li – 54%), при 6,25 мкг/мл – 2,7 Гр (ОБЭ) (вклад дозы продуктов реакции <sup>10</sup>B(n, α)<sup>7</sup>Li – 36%).

Коэффициент СБЕ для реакции <sup>10</sup>B(n, α)<sup>7</sup>Li брали равным 3,8 для опухолевой ткани и 1,3 для здоровой; ОБЭ для нейтронов принимали 3,2, для гамма-излучения – 1,0 [1]. В расчёте были получены следующие физические величины мощности поглощенной дозы (Гр/с) компонентов излучения (табл. 1).

**Клоногенный тест.** Концентрацию клеток в облученной суспензии подсчитывали при помощи камеры Горяева и микроскопа Zeiss Primo Vert (Германия). Облученные и контрольные группы клеток высевали по 200 клеток на лунку 6-луночного культурального планшета. При посеве было выполнено по 3 повтора для каждой экспериментальной точки, что в итоге составило по 9 повторов на каждую группу и является достаточным для оценки статистической значимости полученных результатов [17].

Клетки культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C, в течение 9–10 сут в зависимости от линии. При подсчете учитывали только те колонии, которые содержали более 50 клеток [17]. Колонии фиксировали 10% формалином (Panreac AppliChem, Германия) и окрашивали кристаллическим фиолетовым 1% (Sigma, США), затем подсчитывали их количество. Долю выживших клеток в экспериментальных точках рассчитывали с учетом выживаемости в контроле.

**Определение накопления бора.** Клетки линий U251 и SK-Mel28 инкубировали вышеописанным способом: опытные группы с борфенилаланином, контрольные без добавления препарата. Затем клетки отмывали от препарата при помощи трипсин-версена и проводили подсчет их количества в каждом образце. Подготовку проб осуществляли методом мокрого озоления при помощи концентрированной азотной кислоты. Поглощение бора клетками измеряли на атомно-эмиссионном спектрометре ICPE-9820 (Shimadzu, Япония).

Таблица 1

Вклад в дозу различных компонентов нейтронного пучка

Тепловые нейтроны, Гр/с	Быстрые нейтроны, Гр/с	Продукты реакции <sup>10</sup> B(n, α) <sup>7</sup> Li (Гр/с) при 1 ppm <sup>10</sup> B	Гамма-излучение, Гр/с
4,5·10 <sup>-5</sup>	5,57·10 <sup>-5</sup>	2,18·10 <sup>-5</sup>	5,5·10 <sup>-4</sup>

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010 и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартное отклонение. Используемый уровень значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В эксперименте было проведено облучение нейтронами в присутствии  $^{10}\text{B}$  с концентрациями 0–50 мкг/мл 2 опухолевых клеточных линий человека: глиомы U251 и меланомы SK-Mel28. Данные клоногенного анализа позволили оценить влияние нейтронного потока на эти линии клеток как в присутствии изотопа  $^{10}\text{B}$ , так и без него.

На рис. 1 представлены данные изменения выживаемости клеток U251 (а) и SK-Mel28 (б) после воздействия нейтронов в зависимости от концентрации  $^{10}\text{B}$ . Видно, что увеличение концентрации борфенилаланина с последующим облучением клеток пучком нейтронов приводит к уменьшению их выживаемости. Это может быть связано с увеличением количества атомов бора в клетках, а, следовательно, с увеличением количества нейтронозахватных событий, в результате которых образуются  $\alpha$ -частицы и атомные ядра лития с высокой ЛПЭ (линейной передачей энергии).

При облучении клеток U251 (рис. 1, а) и SK-Mel28 (рис. 1, б), инкубированных с бором с концентрацией  $^{10}\text{B}$  6,25 мкг/мл, доля выживших клеток уменьшилась в 10 раз. При взаимодействии клеток глиомы, содержащих 25 мкг/мл бора с пучком нейтронов, доля выживших клеток U251 составляет лишь 1,5 %, то есть происходит уменьшение количества колоний в 67 раз в сравнении с контролем без облучения. Клетки мела-

номы, инкубированные с борфенилаланином с концентрацией  $^{10}\text{B}$  25 мкг/мл, не образовали ни одной колонии. Выживаемость клеток в образцах без препарата борфенилаланина, которые были также облучены, составила 44 % для линии меланомы и 40% для глиомы. Уменьшение выживаемости клеток без бора связано с полученной ими дозы следующих компонент ионизирующего излучения, неизбежно присутствующих в терапевтическом пучке нейтронов: гамма-излучения, испускаемого из мишени в результате взаимодействия протонов с литием, гамма-излучения, испускаемого при поглощении тепловых нейтронов атомными ядрами водорода, протонов отдачи, возникающих в результате поглощения тепловых нейтронов атомными ядрами азота, и протонов отдачи, возникающих в процессе упругого рассеяния быстрых нейтронов, преимущественно на атомных ядрах водорода. Похожие результаты получили ученые на реакторе ХАРР: доля выживших клеток глиальных линий составила менее 0,01% после бор-нейтронозахватной терапии с борфенилаланином при поглощенной дозе 4–8 Гр (ОБЭ) [18]. На ядерном реакторе RA-3 в Аргентине была проведена БНЗТ на 2 линиях меланомы и оценена выживаемость клеток при помощи клоногенного теста. При поглощенной дозе 8 Гр (ОБЭ) и концентрации  $^{10}\text{B}$  10 мкг/мл фракция выживших клеток составила менее 1% [12].

Измерение концентрации бора *in vitro* выявило различное накопление борфенилаланина каждой клеточной линией (рис. 2). Поглощение  $^{10}\text{B}$  клетками линии U251, инкубированными с препаратом борфенилаланин с концентрацией  $^{10}\text{B}$  6,25 мкг/мл в течение 24 ч, составило 0,438 мкг/ $10^7$  клеток, а линии SK-Mel28 – 0,155 мкг/ $10^7$  клеток. При инкубации с борфенилаланином с

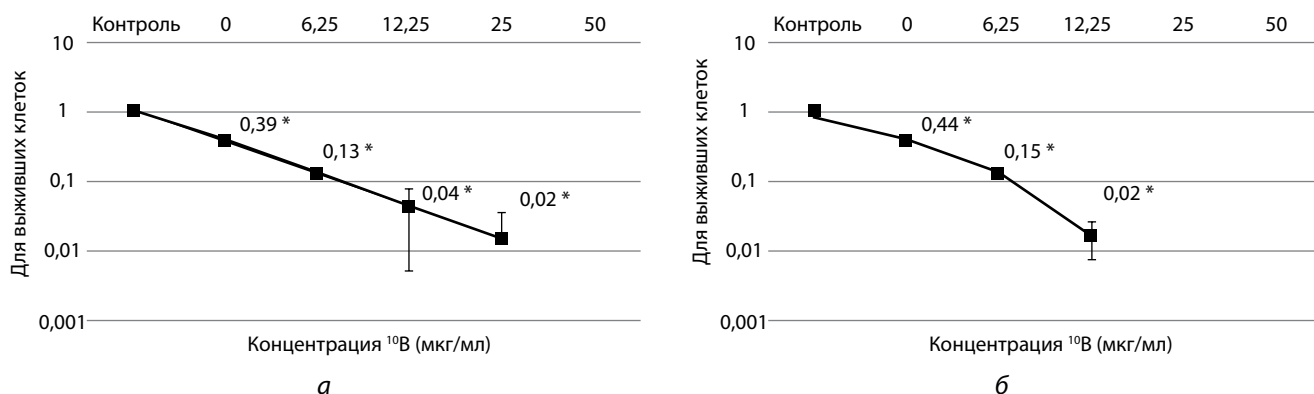


Рис. 1. Выживаемость клеток U251 (а) и SK-Mel28 (б) после воздействия нейтронов в зависимости от концентрации  $^{10}\text{B}$  (\* значимое отличие от контроля).

концентрацией  $^{10}\text{B}$  25 мкг/мл накопление  $^{10}\text{B}$  клетками U251 составило 0,895 мкг/ $10^7$  клеток, а для SK-Mel28 — 1,309 мкг/ $10^7$  клеток. Эти данные свидетельствуют о лучшем поглощении и накоплении борфенилаланина клетками меланомы, чем клетками глиомы. Другие исследователи также оценивали накопление бора линиями меланомы, которые инкубировали с борфенилаланином в концентрации  $^{10}\text{B}$  50 мкг/мл. Концентрация  $^{10}\text{B}$  составила 1,19–1,09 мкг/ $10^7$  клеток [14].

В исследовании Ёшида и соавторов, проведенном на клеточных линиях крысиной глиомы и мышинной саркомы, накопление бора через 24 ч после начала инкубации с борфенилаланином в концентрации  $^{10}\text{B}$  60 мкг/мл составило 2,5 мкг/ $10^7$  клеток для глиальной линии и 1,5 — для линии мышинной саркомы [19].

Таким образом, обе линии клеток, U251 и SK-Mel28 отвечают на БНЗТ снижением колониеобразующей способности, в особенности линия меланомы, которая накапливает бор в большей концентрации. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что увеличение накопления  $^{10}\text{B}$  клетками с последующим облучением нейтронами приводит к снижению выживаемости клеточных культур, подвергнутых БНЗТ, с увеличением количества накапливаемого  $^{10}\text{B}$ , т. е. отчетливо проявляется зависимость доза—эффект.

Ранее была доказана безопасность борфенилаланина *in vitro* при использовании в концентрациях, представленных в настоящей работе. О.Ю. Волкова и соавторы показали, что добавление борфенилаланина в ростовую среду в концентрации 100 ppm  $^{10}\text{B}$  не влияет на эффективность колониеобразования клеток гли-

альных линий [15]. Это подтверждает, что полученный эффект вызван именно взаимодействием нейтронов с ядрами  $^{10}\text{B}$ , а не с токсическим действием препарата.

### Заключение

Бор-нейтронозахватная терапия является перспективным методом лечения пациентов с агрессивными, рецидивирующими опухолями. Несмотря на положительный результат, в настоящее время БНЗТ пациентов официально не проводится ни на реакторах, ни на разрабатываемых ускорителях. В России данный вид терапии ранее на практике не применялся. Сегодня появилась возможность проводить доклинические испытания для подтверждения эффективности и безопасности БНЗТ в присутствии конкретного пучка эпитепловых нейтронов, полученного на источнике ускорительного типа в ИЯФ СО РАН.

Учитывая уникальность ускорителя и дефицит прямой экспериментальной информации о характере и свойствах биологических эффектов генерируемого пучка, ценными данными в исследовании явились показатели снижения колониеобразования в облученном контроле клеток, не содержащих  $^{10}\text{B}$ . Наличие различий в выживаемости клеток, облученных без бора и с бором, доказывает присутствие в спектре пучка составляющей тепловых нейтронов, достаточной для получения объективных свидетельств биологических эффектов бор-нейтронозахватных событий. Нарастание цитотоксических эффектов облучения с увеличением содержания внутриклеточного бора при облучении на ускорителе практически демонстрирует не только классические биологические эффекты бор-нейтронозахватных событий реакции  $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ , их концентрационную зависимость, но и возможность дифференцированного подхода в экспериментах *in vitro* в отношении подбора и изменения поглощенных доз. При этом выявленные различия в накоплении бора клетками опухолей различных гистологических типов требуют при разработке рекомендательных протоколов как учета дозозависимой специфики накопления  $^{10}\text{B}$ , так и проведения дополнительных экспериментов *in vivo*.

### Литература

(п.п. 1-4; 9; 11-14; 17-19 см. References)

- Таскаев С. Ю. Ускорительный источник эпитепловых нейтронов. *Физика элементарных частиц и атомного ядра*. 2015; 46 (6): 1770-830.
- Иванов А.А., Касатов Д.А., Кошкарёв А.М., Макаров А.Н., Остринов Ю.М., Сорокин И.Н. и др. Получение протонного пучка с током 5 мА в ускорителе-тандеме с вакуумной изоляцией. *Письма в ЖТФ*. 2016; 42(12): 1-8.

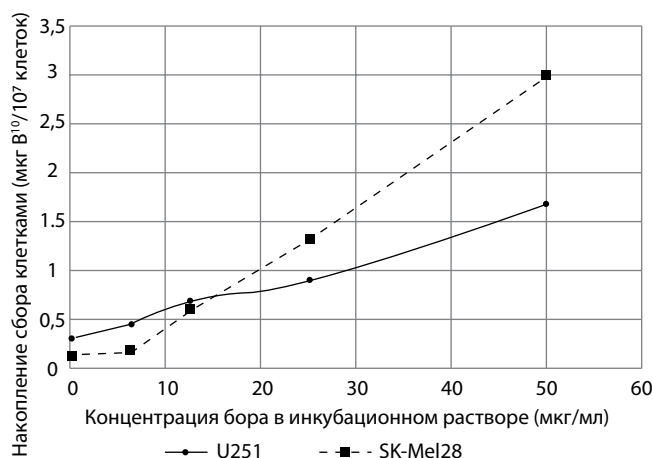


Рис. 2. Накопление  $^{10}\text{B}$  клетками глиомы и меланомы после инкубации в течение 24 ч с борфенилаланином.

7. Быков Т.А., Касатов Д.А., Колесников Я.А., Кошкарёв А.М., Макаров А.Н., Остреинов Ю.М., и др. Измерение проволочным сканером пучка отрицательных ионов водорода, инъецируемого в ускоритель-тандем с вакуумной изоляцией. *Приборы и техника эксперимента*. 2018; 5: 90–5.
8. Заиди Л., Кашаева Е.А., Лежнин С.И., Малышкин Г.Н., Самарин С.И., Сычева Т.В. и др. Система формирования пучка нейтронов для бор-нейтронозахватной терапии. *Ядерная физика*. 2017; 1(80): 63–9.
10. Яруллина А.И., Каныгин В.В., Кичигин А.И., Жданова М.Г., Мухамадияров Р.А., Таскаев С.Ю. Лечение опухолей головного мозга методом бор-нейтронозахватной терапии: трудности и современные решения. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015; 4: 6–11.
15. Волкова О.Ю., Мечетина Л.В., Таранин А.В., Заборонок А.А., Nakai K., Лежнин С.И. и др. Влияние нейтронного излучения на жизнеспособность опухолевых клеток, культивируемых в присутствии изотопа бора <sup>10</sup>B. *Вестник рентгенологии и радиологии*. 2016; 97(5): 283–8.
16. Бывальцев В.А., Завьялов Е.Л., Каныгин В.В., Касатова А.И., Кичигин А.И., Разумов И.А. и др. Цитопатические эффекты бор-нейтронозахватной терапии на ускорительном источнике эпителиальных нейтронов для культуры клеток глиобластомы человека. *Сибирский онкологический журнал*. 2019; 18(4): 34–42. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-4-34-42
7. Bykov T., Kasatov D., Kolesnikov Ya., Koshkarev A., Makarov A., Ostreynov Yu. et al. Use of a Wire Scanner for Measuring a Negative Hydrogen Ion Beam Injected in a Tandem Accelerator with Vacuum Insulation. *Instruments and Experimental Techniques*. 2018; 5: 713–8.
8. Zaidi L., Kashaev E.A., Lezhnin S.I., Malyshekin G.N., Samarin S.I., Sycheva T.V. et al. Neutron-Beam-Shaping Assembly for Boron Neutron-Capture Therapy. *Physics of Atomic Nuclei*. 2017; 80(1): 60–6.
9. Zaidi L., Belgaid M., Taskaev S., Khelifi R. Beam Shaping Assembly Design of <sup>7</sup>Li(p,n)<sup>7</sup>Be Neutron Source for Boron Neutron Capture Therapy of Deep-seated Tumor. *Applied Radiation and Isotopes*. 2018; 139: 316–24.
10. Yarullina A.I., Kanygin V.V., Kichigin A.I., Zhdanova M.G., Mukhamadiyarov R.A., Taskaev S.Yu. Treatment of brain tumors using boron-neutron capture therapy method: difficulties and modern solutions. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 4: 6–11. (in Russian)
11. Yamamoto T., Nakai K., Tsurubuchi T., Matsuda M., Shirakawa M., Zaboronok A. et al. Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma: a pilot study in Tsukuba. *Appl Radiat Isot*. 2009; 67(7-8): 25–6.
12. Roth B.M., Bonomi M.R., Gonzalez S.J. et al. *BNCT clinical trials of skin melanoma patients in Argentina*. Proceedings of ICNCT-12. Edited by Nakagawa Y., Kobayashi T. and Fukuda H. 2006: 14–7.
13. Byvaltsev V., Kanygin V., Belykh E., Taskaev S. Prospects in Boron Neutron Capture Therapy of Brain Tumors. *World Neurosurgery*. 2012; 78: 8–9.
14. Rossini A.E., Dagrosa M.A., Portu A., Saint Martin G., Thorp S., Casal M. et al. Assessment of biological effectiveness of boron neutron capture therapy in primary and metastatic melanoma cell lines. *Int J Radiat Biol*. 2015; 91(1): 81–9.
15. Volkova O.Yu., Mechetina L.V., Taranin A.V., Zaboronok A.A., Nakai K., Lezhnin S.I. et al. Influence of neutron radiation on the viability of tumor cells cultured in the presence of isotope <sup>10</sup>B. *Vestnik rentgenologii i radiologii*. 2016; 97(5): 283–8. (in Russian)
16. Byvaltsev V.A., Zavjalov E.L., Kanygin V.V., Kasatova A.I., Kichigin A.I., Razumov I.A. et al. Cytopathic effects of boron neutron capture therapy on an accelerator based epithermal neutrons source on human glioblastoma cell culture. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal*. 2019; 18(4): 34–42. DOI: 10/21294/1814-4861-2019-18-4-34-42. (in Russian)
17. Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J, Haveman J., van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006; 1(5): 2315–9.
18. Wang P., Zhen H., Jiang X., Zhang W., Cheng X., Guo G. et al. Boron neutron capture therapy induces apoptosis of glioma cells through Bcl-2/Bax. *BMC Cancer*. 2010; 661.
19. Yoshida F., Matsumura A., Shibata Y. Cell cycle dependence of boron uptake from two boron compounds used for clinical neutron capture therapy. *Cancer Letters*. 2002; 187: 135–41.

## References

1. Sauerwein W.A.G., Wittig A., Moss R., Nakagawa Y. *Neutron Capture Therapy: Principles and Applications*. Springer; 2012.
2. Kinashi Y., Takahashi S., Kashino G., Okayasu R., Masunaga S., Suzuki M., Ono K. DNA double-strand break induction in Ku80-deficient CHO cells following boron neutron capture reaction. *Radiat Oncol*. 2011; 6: 106.
3. Yamamoto T., Nakai K., Matsumura A. Boron neutron capture therapy for glioblastoma. *Cancer Letters*. 2008; 262: 143–52.
4. Madoc-Jones H., Zamenhof R., Solares G., Harling O., Yam C-S., Riley K. et al. Atkins A Phase-I Dose-Escalation Trial of Boron Neutron Capture Therapy for Subjects with Metastatic Subcutaneous Melanoma of the Extremities. *Cancer Neutron Capture Therapy*. 1996; 707–16.
5. Taskaev S. Accelerator based epithermal neutron source. *Physics of Particles and Nuclei*. 2015; 46(6): 956–90.
6. Ivanov A., Kasatov D., Koshkarev A., Makarov A., Ostreynov Yu., Sorokin I. et al. Obtaining a Proton Beam with 5-mA Current in a Tandem Accelerator with Vacuum Insulation. *Technical Physics Letters*. 2016; 42(12): 608–11.

## Сведения об авторах:

**Касатова Анна Исмагиловна**, аспирант каф. нейрохирургии ИГМУ, мл. науч. сотр. лаб. МБП БНЗТ НГУ, мл. науч. сотр. ИЯФ СО РАН, e-mail: yarullinaai@yahoo.com;

**Каныгин Владимир Владимирович**, канд. мед. наук, доцент, зав. лаб. МБП БНЗТ НГУ, e-mail: kanigin@mail.ru;

**Разумов Иван Алексеевич**, доктор биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. молекулярных механизмов патологических процессов, ИЦИГ СО РАН; МБП БНЗТ НГУ, e-mail: razumov@bionet.nsc.ru;

**Таскаев Сергей Юрьевич**, доктор физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. ИЯФ СО РАН, зав. лаб. БНЗТ НГУ, e-mail: taskaev@inp.nsk.su;

**Касатов Дмитрий Александрович**, мл. науч. сотр. ИЯФ СО РАН; лаб. МБП БНЗТ НГУ, e-mail: kasatovd@gmail.com;

**Бывальцев Вадим Анатольевич**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нейрохирургии и инновационной медицины Иркутского государственного медицинского университета, главный нейрохирург Дирекции здравоохранения ОАО РЖД; руководитель Центра нейрохирургии «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Иркутска», e-mail: byval75vadim@yandex.ru