

**РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПУЧКА УСКОРИТЕЛЬНОГО ИСТОЧНИКА
НЕЙТРОНОВ В ИНСТИТУТЕ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ ИМ. Г.И. БУДКЕРА СО РАН.**

**Каныгин В.В.^{1,2,4}, Кичигин А.И.^{2,4}, Завьялов Е.Л.^{2,3}, Разумов И.А.^{2,3}, Симонович А.Е.^{1,5},
Таскаев С.Ю.^{2,4}**

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава
России», Новосибирск,

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный
университет», Новосибирск,

³ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск,

⁴ФГБУН «Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской
академии наук», Новосибирск

⁵ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им.
Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск.

Каныгин Владимир Владимирович, к.м.н., заведующий лабораторией медико-биологических
проблем БНЗТ Новосибирского национального исследовательского государственного
университета, доцент кафедры нейрохирургии Новосибирского государственного
медицинского университета.

Индекс Хирша 3. E-mail: kanigin@mail.ru

Кичигин Александр Иванович, научный сотрудник лаборатории медико-биологических
проблем БНЗТ Новосибирского национального исследовательского государственного
университета.

Индекс Хирша 5. E-mail: sam@211.ru

Завьялов Евгений Леонидович, к. б. н., заведующий SPF-виварий, института цитологии и
генетики СО РАН, научный сотрудник лаборатории медико-биологических проблем БНЗТ
Новосибирского национального исследовательского государственного университета.

Индекс Хирша 7. E-mail: zavjalov@bionet.nsc.ru

Разумов Иван Алексеевич, д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медико-
биологических проблем БНЗТ Новосибирского государственного университета/

Индекс Хирша 9. E-mail: razumov@bionet.nsc.ru

Симонович Александр Евгеньевич д.м.н., профессор, кафедры нейрохирургии
Новосибирского национального исследовательского государственного медицинского
университета.

Индекс Хирша 11. E-mail: alsimonovich@yandex.ru

Таскаев Сергей Юрьевич, д.ф.-м.н., заведующий лабораторией БНЗТ института ядерной
физики им. Г.И. Будкера СО РАН.

Индекс Хирша 13. E-mail: taskaev.sergey@gmail.com

Аннотация

Проведена радиобиологическая оценка пучка ускорительного источника нейтронов в Институте ядерной
физики им. Г.И. Будкера. Проведено нейтронное облучение линии клеток U87 (глиобластома) и FetMSC
(эмбриональный костный мозг человека). В экспериментах *in vivo* изучали радиобиологические эффекты
нейтронного облучения у иммунодефицитных мышей SCID.

В экспериментах *in vitro* образцы помещались в плексигласовый фантом. Облучение клеточных культур
проходило при следующих параметрах: энергия протонов 2,0 МэВЭ, интеграл тока до 2,69 мА*ч. После
облучения через 48 и 96 часов проводили МТТ-тест. В экспериментах *in vivo* мышей облучали
эпитемальными нейтронами с энергией протонов 2,0 МэВ и интегралом тока 3,78-7,56 мА*ч.

Линия FetMSC, была более толерантна к облучению эпитеральными нейтронами, в то время как ответ линии опухоли U87 был более заметным. Облучение снижало долю выживаемости клеток U87 на 27% и клеток FetMSC на 7%.

Все лабораторные животные были живы через 1 месяц после облучения. Внешние патологические признаки были обнаружены у мышей, получавших дозы от 4,48 мА*ч при энергии протонов 2,0 МэВ в виде трофических нарушений кожи и снижения массы тела. Эксперимент показал, что терапевтическая доза, полученная здоровыми тканями мышей при облучении, хорошо переносилась, а патологические структурные изменения в исследуемых тканях, подвергшихся облучению, не выявлялись. Однако при высоких дозах облучения были выявлены обратимые изменения в тканях, преимущественно в тонком кишечнике и костном мозге.

Наши эксперименты с нормальными и опухолевыми клеточными линиями, облученными различными дозами, показывают, что эффект только нейтронного облучения без бора-10 незначителен для нормальных клеток. Экспериментальные данные на животных показывают, что дозы до 4,48 мА*ч при энергии протонов 2,0 МэВ были оптимальными для проведения экспериментов BNCT in vivo.

Ключевые слова: бор-нейтронозахватная терапия, БНЗТ, радиобиологические исследования, ускорительный источник нейтронов, глиома

RADIOBIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF THE ACCELERATOR-BASED NEUTRON BEAM IN VITRO AND IN VIVO AT THE BINP AT THE BUDKER INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS.

**Kanygin V.V.^{1,2,4}, Kichigin A.^{2,4}, Zavjalov E.L.^{2,3}, Razumov I.A.^{2,3}, Simonovich A.E.^{1,5},
Taskaev S.Yu.^{2,4}**

¹ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk,

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk,

³ Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk,

⁴ The Budker Institute of Nuclear Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

⁵ Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Ortopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk

Abstract

The safety assessment of the beam of the accelerator neutron source at the Institute of nuclear physics was carried out. Neutron irradiation of U87 (glioblastoma) and FetMSC (human embryonic bone marrow) cell lines was performed. In vivo experiments studied the radiobiological effects of neutron irradiation in immunodeficient SCID mice.

In in vitro experiments, samples were placed in a plexiglass phantom. Irradiation lasted with proton energy of 2.0 MeV and current integral to 2.69 mA * h. after irradiation, a MTT test was performed 48 and 96 hours later. In vivo experiments, mice were irradiated with epithermal neutrons with a proton energy of 2.0 MeV and a current integral of 3,78-7.56 mA * h.

FetMSC line was more tolerant to epithermal neutron irradiation, while the U87 tumor line response was more prominent. Irradiation reduced the survival rate of U87 cells by 27% and FetMSC cells by 7%. All laboratory animals were alive 1 month after exposure. External pathological signs were found in mice receiving doses of 4.48 mA * h at a proton energy of 2.0 MeV in the form of trophic skin disorders and weight loss. The experiment showed that the therapeutic dose received by healthy tissues of mice under irradiation was well tolerated, and pathological structural changes in the studied tissues exposed to radiation were not detected. However, at high doses of radiation, reversible changes were detected in tissues, mainly in the small intestine and bone marrow.

Our experiments with normal and tumor cell lines irradiated with different doses show that the effect of neutron irradiation alone without boron-10 is negligible for normal cells. Experimental data on animals show that doses up to 4.48 mA * h at proton energy 2.0 MeV were optimal for BNCT experiments in vivo.

Key words: boron neutron capture therapy, BNCT, radiobiological studies, accelerator-based neutron source, glioma

Введение

БНЗТ является перспективным и постоянно развивающимся методом лечения рака. Для дальнейшего развития метода необходимо продолжение разработки источников нейтронов, соединений бора и методов дозиметрии. Что касается нейтронного облучения для БНЗТ, то перспективными являются источники нейтронов на основе ускорителей, и за последние 30 лет было предложено большое количество таких проектов [1]. Оптимально терапевтический пучок нейтронов обеспечивается реакциями ${}^7\text{Li}(p,n){}^7\text{Be}$ или ${}^9\text{Be}(p,n){}^9\text{B}$ из-за низкой энергии генерируемых нейтронов. В рамках одного из проектов в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера, г.Новосибирск, был разработан ускоритель на основе эпитеpmального источника нейтронов с твердой литиевой мишенью и током протонного пучка до 8,7 мА [2]. Затем была создана лаборатория медико-биологических проблем БНЗТ на базе Новосибирского государственного университета и проведена серия экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* для определения оптимальных параметров пучка нейтронов.

Цель исследования

Целью данного исследования была оценка оптимальных и максимальных доз для клеточных линий и животных. Для этого использовали линии клеток U87 (глиобластома), FetMSC (мезенхимальные клетки человеческого эмбриона) и SCID-мышей.

Материалы и методы

Клетки культивировали в среде DMEM / F12 (1:1) (Биолот, Санкт-Петербург, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Массачусетс, США) и гентамицина 50 мкг / мл (Дальхимфарм, Хабаровск, Россия) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

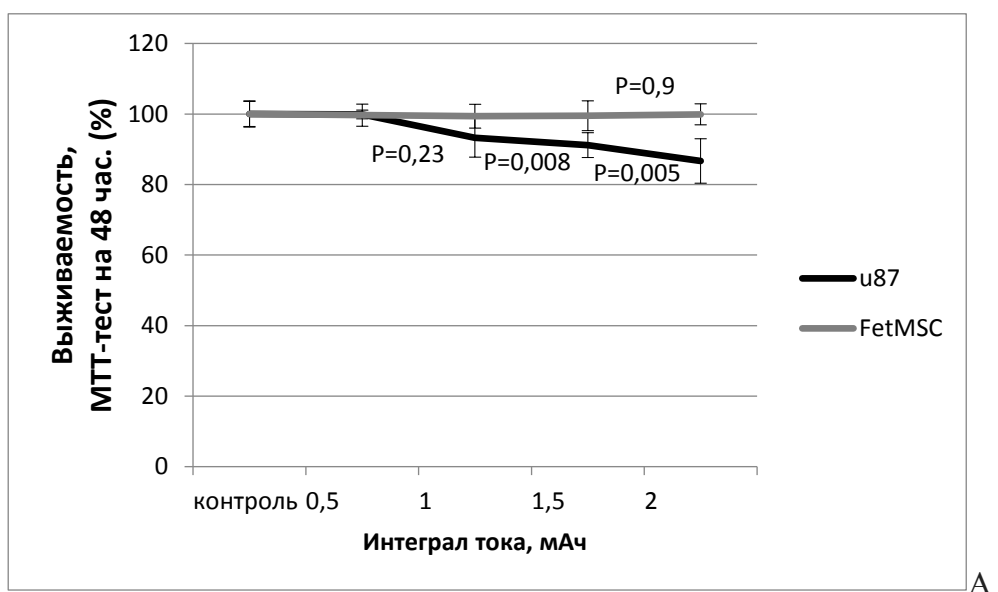
Для экспериментов *in vitro* образцы помещали в плексигласовый фантом под литиевой мишенью ускорителя. Облучение проведено с энергией протонов 2,0 МэВ и интегралом тока до 2,69 мА*ч. После облучения 10⁴ клеток на лунку помещали в 96-луночные пластины для МТТ-теста через 48 и 96 часов после облучения.

Все эксперименты на животных были одобрены межинститутской комиссией по биоэтике и соответствуют принципам Руководства по уходу и использованию лабораторных животных, изданного US NIH (№ 85-23, пересмотрено в 1985 г.).

В данном исследовании использовали мышей-самцов SCID (SHO-PrkdcscidHrhr) в состоянии SPF в возрасте 8-12 недель. Экспериментальные животные содержались в индивидуально вентилируемых клетках семейными группами по 2-5 особей в виварии SPF Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (СО РАН). Мышей облучали пучком эпитеpmальных нейтронов с энергией протонов 2,0 МэВ и интегралом тока 3,78-4,48 мА*ч, а одну группу облучали до набора интеграла тока 7,56 мА*ч. В качестве контроля использовали необлученных животных. Характеристики пучка и расчет дозы облучения были описаны ранее [3].

Результаты

Поскольку нормальные ткани хорошо переносят нейтронное излучение, FetMSC, линия, полученная из нормальной эмбриональной ткани, оказалась более толерантной к эпитеpmальному нейтронному облучению, в то время как ответ опухолевой линии U87 был более заметным. Гибель клеток, основанная на времени, прошедшем с момента облучения, была очевидной: через 48 часов после облучения выживаемость U87 снизилась до 86,7% и до 73,6% через 96 часов. Напротив, выживаемость FetMSC по сравнению с контролем снизилась незначительно: через 48 ч после облучения выживаемость снизилась менее чем на 1%, а через 96 ч-на 7% (Рис.1 А, Б). Наши данные согласуются с предыдущими исследованиями по облучению клеточных линий U251MG, CHO-K1, V79 на ускорителе с током 1.5–3.0 мА при энергии протонов 2 МэВ [4], а также аналогичного облучения клеточной линии U87 пучком с энергией протонов 2 МэВ и токе 2,6 мА [5].



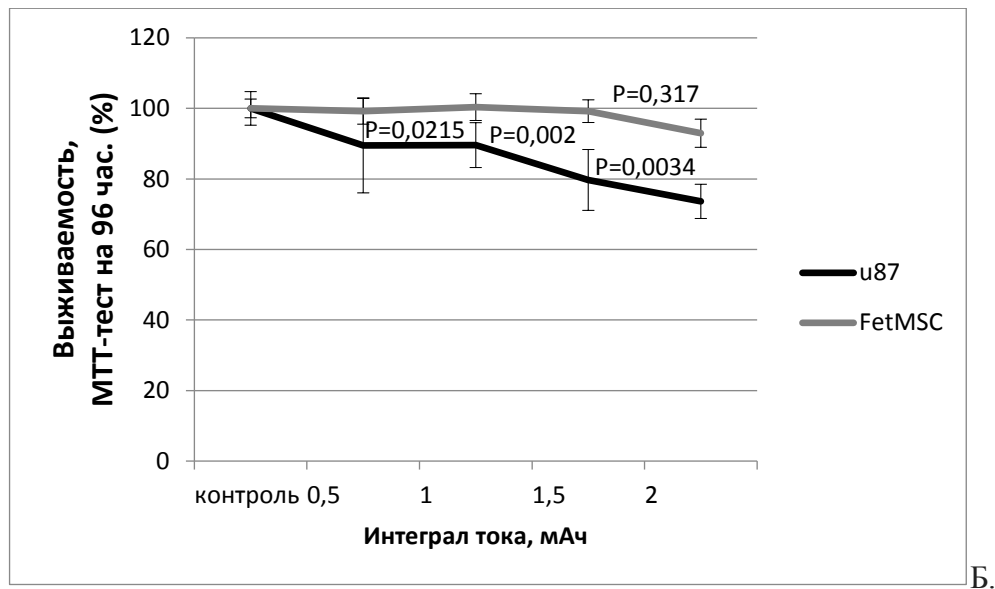


Рис. 1 А. Выживаемость клеток в зависимости от дозы облучения, МТТ-тест на 48 часов;
 Б. Выживаемость клеток в зависимости от дозы облучения, МТТ-тест на 96 часов.

В экспериментах на животных изучали радиобиологические эффекты облучения пучком нейтронов с энергией протонов 2,0 МэВ в интегральных характеристиках тока от 3,78 до 7,56 мА*ч. По нашим наблюдениям, у мышей, подвергнутых облучению в дозах менее 4,48 мА*ч, не было выявлено патологических внешних признаков от облучения, снижения массы тела и летальных исходов в течение 30 дней после облучения. Внешние патологические признаки в виде трофических нарушений кожи (снижение эластичности, сухость, шелушение, эрозия) и снижение массы тела были обнаружены у мышей, получавших дозы от 4,48 мА*ч, но эти животные были живы через 1 месяц и постепенно набирали вес (Рис. 2).

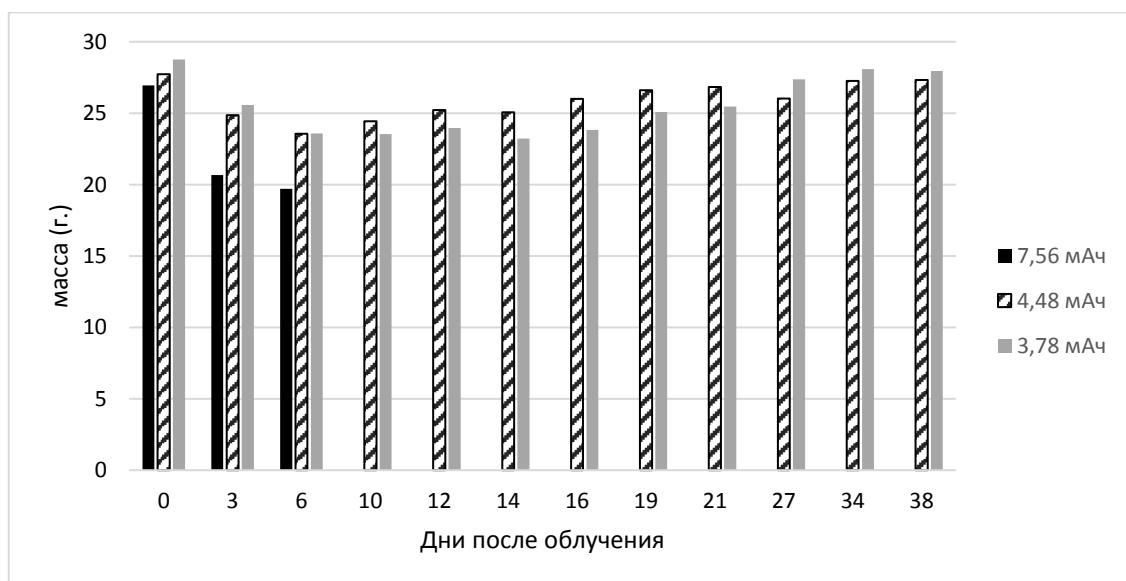


Рис. 2. Масса животных (мыши SCID) после облучения в дозах от 3,78 до 7.56 мАч.

Доза облучения с энергией протонов 2,0 МэВ и интегралом тока 7,56 мА*ч была полностью летальной (LD100) для мышей, с медианой выживаемости $4,7 \pm 3,2$ дня. Эксперимент показывает, что терапевтические дозы, полученные здоровыми мышинными тканями во время облучения, хорошо переносятся. В предыдущих экспериментах по изучению радиобиологических эффектов *in vivo* доза облучения мышей, получавших инъекции боркаптата BSH (200 мг/кг внутривнутрибрюшинно), не превышала 5,7 гр-экв и составляла 2 гр-экв у мышей, не получавших BSH [6].

Наши эксперименты показали оптимальные дозы, для мышей SCID, которые хорошо переносятся животными, и при которых нет патологических структурных изменений в исследуемых тканях и органах. Настоящее исследование также подтверждает результаты предыдущего морфологического исследования, в котором обратимые изменения в костном мозге и тонком кишечнике мышей наблюдались на 2-й и 9-й день после высоких доз нейтронного облучения. [7].

Заключение

В настоящее время научно-исследовательская группа физиков Института ядерной физики имени Будкера решает сложную научно-техническую задачу создания компактного источника эпитеpmальных нейтронов на основе ускорителя заряженных частиц. Это создает уникальную возможность для биологов провести экспериментальные исследования радиобиологических эффектов нейтронного потока, а также эффективности БНЗТ. Наши эксперименты с нормальными и опухолевыми клеточными линиями, облученными различными дозами, свидетельствуют о том, что негативные эффекты облучения пучком нейтронов в рекомендуемых дозах незначительны и оптимальны для проведения экспериментов по БНЗТ *in vitro* и *in vivo*.

Благодарность

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-01007 и за счет гранта Российского научного фонда (проект №19-72-30005) при поддержке Института ядерной физики СО РАН.

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

Список литературы

1. Barth, R.F., Zhang, Z., Liu, T., 2018. A realistic appraisal of boron neutron capture therapy as a cancer treatment modality. *Cancer Commun (Lond)*. 38:36. <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0280-5>.
2. Taskaev., S., 2015. Accelerator Based Epithermal Neutron Source. *Physics of Particles and Nuclei*, 46:956-990. <https://doi.org/10.1134/S1063779615060064>
3. Sato, E., Zaboronok, A., Yamamoto, T., Nakai, K., Taskaev, S., Volkova, O., Mechetina, L., Taranin, A., Kanygin, V., Isobe, T., Mathis, B. J., Matsumura, A., 2018. Radiobiological response of U251MG, CHO-K1 and V79 cell lines to accelerator-based boron neutron capture therapy. *J Radiat Res*. 59:101-107. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrx071>.
4. Zaboronok, A., Byvaltsev, V., Kanygin, V., Iarullina, A., Kichigin, A., Taranin, A., Volkova, O., Mechetina, L., Taskaev, S., Muhamadiyarov, R., Zavyalov, E., Nakai, K., Sato, E., Yamamoto, T., Mathis, B.J., Matsumura, A., 2017. Boron-neutron capture therapy in Russia: preclinical evaluation of efficacy and perspectives of its application in neurooncology. *New Armenian Medical Journal*. 11:6-15.
5. Byvaltsev V.A., Zavyalov E.L., Kanygin V.V., Kasatova A.I., Kichigin A.I., Razumov I.A., Sycheva T.V., Taskaev S.Yu. Cytopathic effects of accelerator-based boron neutron capture therapy on human glioblastoma cells. *Siberian Journal of Oncology*. 2019; 18(4): 34–42. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-4-34-42.
6. Kanygin, V., Kichigin, A., Krivoschapkin, A., Taskaev, S., 2017. Perspectives of boron neutron capture therapy of malignant brain tumors. *AIP Conference Proceedings*. 1882:020030. <https://doi.org/10.1063/1.5001609>
7. Zaidi, L., Belgaid, M., Taskaev, S., Khelifi, R., 2018. Beam shaping assembly design of ${}^7\text{Li}(p,n){}^7\text{Be}$ neutron source for boron neutron capture therapy of deep-seated tumor. *Appl Radiat Isot*. 139:316-324. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2018.05.029>