

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И НАКОПЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ БОРА И ЛИТИЯ В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ КОЖИ *IN VITRO*

А.И.Касатова^{1,2}, И.А.Разумов^{1,3}, С.Ю.Таскаев¹, Ю.С.Таскаева^{1,2}

¹ФГБУ Институт ядерной физики им. Г.И.Будкера СО РАН, Новосибирск, РФ;

²Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, РФ; ³ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, РФ

Оценивали цитотоксичность и накопление бора и лития клетками меланомы кожи человека и мышци и фибробластами человека. С помощью МТТ-теста определяли цитотоксичность препаратов бора и лития в диапазоне концентраций бора и лития от 10 до 640 мкг/мл. Выживаемость клеток статистически значимо снижается при инкубации с бором и литием в концентрациях выше 160 мкг/мл. Для оценки накопления бора и лития измеряли концентрацию элементов методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой. Было установлено значительно более высокое накопление клетками меланомы лития по сравнению с бором. Полученные результаты свидетельствуют о возможности безопасного использования солей лития в концентрациях, минимально необходимых для успешной нейтронозахватной терапии.

Ключевые слова: борфенилаланин; боркапнат; соли лития; меланома кожи; нейтронозахватная терапия

Разработка технологий селективного уничтожения раковых клеток является актуальным направлением в онкологии, и одной из таких методик является бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ). Данная технология основана на способности нерадиоактивного изотопа ^{10}B взаимодействовать с тепловым нейтроном, в результате ядерной реакции $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ [1] происходит выделение 84 % энергии в пределах одной клетки. Клинические испытания БНЗТ начинались с использования борной кислоты и её солей в качестве агента доставки бора [2]. В настоящее время, несмотря на активное развитие химии борсодержащих соединений, коммерчески доступными и зарегистрированными для проведения клинических испытаний агентами являются препараты второго поколения — борфенилала-

нин и боркапнат [3-5], хотя они в полной мере не отвечают требованиям, предъявляемым к борсодержащим агентам для БНЗТ [6,7]. Высокие концентрации бора в опухоли были получены при использовании препаратов бора последнего поколения, которые существенно повышают селективность его доставки к опухолевым клеткам (липосомы, полимеры, наночастицы, аптамеры и др.), в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [8,9], тем не менее, внедрения их в практику клинических исследований не произошло.

Использование лития вместо бора в нейтронозахватной терапии (НЗТ) представляет собой перспективное направление развития этой технологии. Литий обладает большим сечением поглощения тепловых нейтронов (940 барн) [1] и при взаимодействии с нейтроном происходит 100 % локальное энерговыделение внутри клетки за счёт высокой линейной передачи энергии продуктов реакции. По данным литературы, для успешной бор-нейтронозахватной реакции тре-

Адрес для корреспонденции: yarullinaai@yahoo.com. Касатова А.И.

DOI 10.47056/0365-9615-2024-177-6-717-722

буется концентрация бора в опухоли не менее 20 мкг/г [1,6]. Согласно теоретическим расчётам, сечение поглощения нейтрона для ${}^6\text{Li}$ в 4 раза меньше, чем для ${}^{10}\text{B}$ (940 б против 3835 б), а энергосодержание реакции ${}^6\text{Li}(n,\alpha){}^3\text{H}$ в 2 раза больше, чем реакции ${}^{10}\text{B}(n,\alpha){}^7\text{Li}$ (4.785 МэВ против 84% от 2.79 МэВ), следовательно для успешной нейтронозахватной реакции с литием оптимальная концентрация лития в опухоли должна составлять 40 мкг/г и более. В настоящее время неизвестно, насколько эффективно литий будет поглощаться опухолевыми клетками по сравнению с бором. Ранее были проведены единичные исследования о способности опухолевых клеток накапливать литий [10,11], однако способность клеток меланомы поглощать литий до сих пор неизвестна.

Целью данной работы являлась сравнительная оценка цитотоксичности и накопления бора и лития для определения возможности использования лития в НЗТ.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценку цитотоксичности препаратов и накопления бора и лития *in vitro* проводили с использованием клеточных культур VJ-5ta (нормальные фибробласты человека), В16 (меланома кожи мыши) и SK-Mel-28 (меланома кожи человека), полученных в ИЦиГ СО РАН.

Для оценки цитотоксичности препаратов бора (борфенилаланин и боркапнат; Katchem) и лития (лития карбонат и лития цитрат; Новосибирский завод редких металлов) использовали МТТ-тест (пять повторов для каждой экспериментальной группы). Клетки высевали в 96-луночный планшет по 4×10^4 на лунку. Затем в лунки добавляли препараты бора и лития в диапазоне концентраций элементов в растворе от 10 до 640 мкг/мл. В качестве контроля использовали лунки с клетками со средой без препаратов. Через 24 ч в каждую лунку добавляли 10 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл и 100 мкл среды без сыворотки. Оптическую плотность (ОП) растворов измеряли на спектрофотометре Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific) при длине волны 595 нм. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле:

$$\frac{\text{ОП}_{\text{опыт}}}{\text{ОП}_{\text{контроль}}} \times 100\%$$

Для анализа концентрации бора и лития в клетках использовали атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой (АЭС ИСП). Клетки инкубировали во флаконах с площадью поверхности 25 см² в течение 24 ч, затем среду меняли на содержащую

препараты бора или лития в концентрации бора или лития 40 мкг/мл культуральной среды, далее флаконы инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Клетки, которые культивировали без препаратов бора или лития, были использованы в качестве контроля. Клетки снимали с пластика и считали их количество в каждом образце. Пробоподготовку образцов проводили методом мокрого озонения с использованием концентрированной азотной кислоты HNO_3 (х.ч., Panreac AppliChem) при 90 °С в системе нагревания Dry Block Heater 2 (КА). Измерение концентрации бора и лития (три повтора для каждой экспериментальной группы) проводили на спектрометре высокого разрешения ICPE-9820 (Shimadzu). Градуировочные зависимости строили с использованием одноэлементного стандартного раствора бора Boron Standart for ICP (Sigma-Aldrich) или лития Lithium Single Element Std. Soln. for ICP (Central Drug House (P) Ltd) в диапазоне 0.01-10 мг/л. Для получения итоговой концентрации бора или лития в клетках использовали формулу: измеренная концентрация \times объём образца / количество клеток $\times 10^6$.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакетов программ MS Excel (Microsoft Corp.) и Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Данные представлены в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD). Для оценки достоверности различий между изучаемыми параметрами использовали U критерий Манна—Уитни (непараметрическая статистика) при уровне достоверности 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Максимальная нетоксичная концентрация бора для фибробластов VJ-5ta составила 80 мкг/мл (рис. 1). При сокультивировании клеток меланомы кожи мыши В16 с боркапнатом выживаемость клеток значительно не снижалась в диапазоне концентраций бора до 160 мкг/мл, а при введении борфенилаланина — до 320 мкг/мл. Цитотоксическое действие препаратов бора на SK-Mel-28 было выявлено при концентрации бора 640 мкг/мл.

Лития карбонат не оказывал токсического действия на все клеточные линии в диапазоне концентраций лития от 10 до 160 мкг/мл. Лития цитрат также не оказывал токсического эффекта на клеточные культуры VJ-5ta и В16 в диапазоне концентраций лития до 160 мкг/мл, однако выживаемость клеток SK-Mel-28 после инкубации

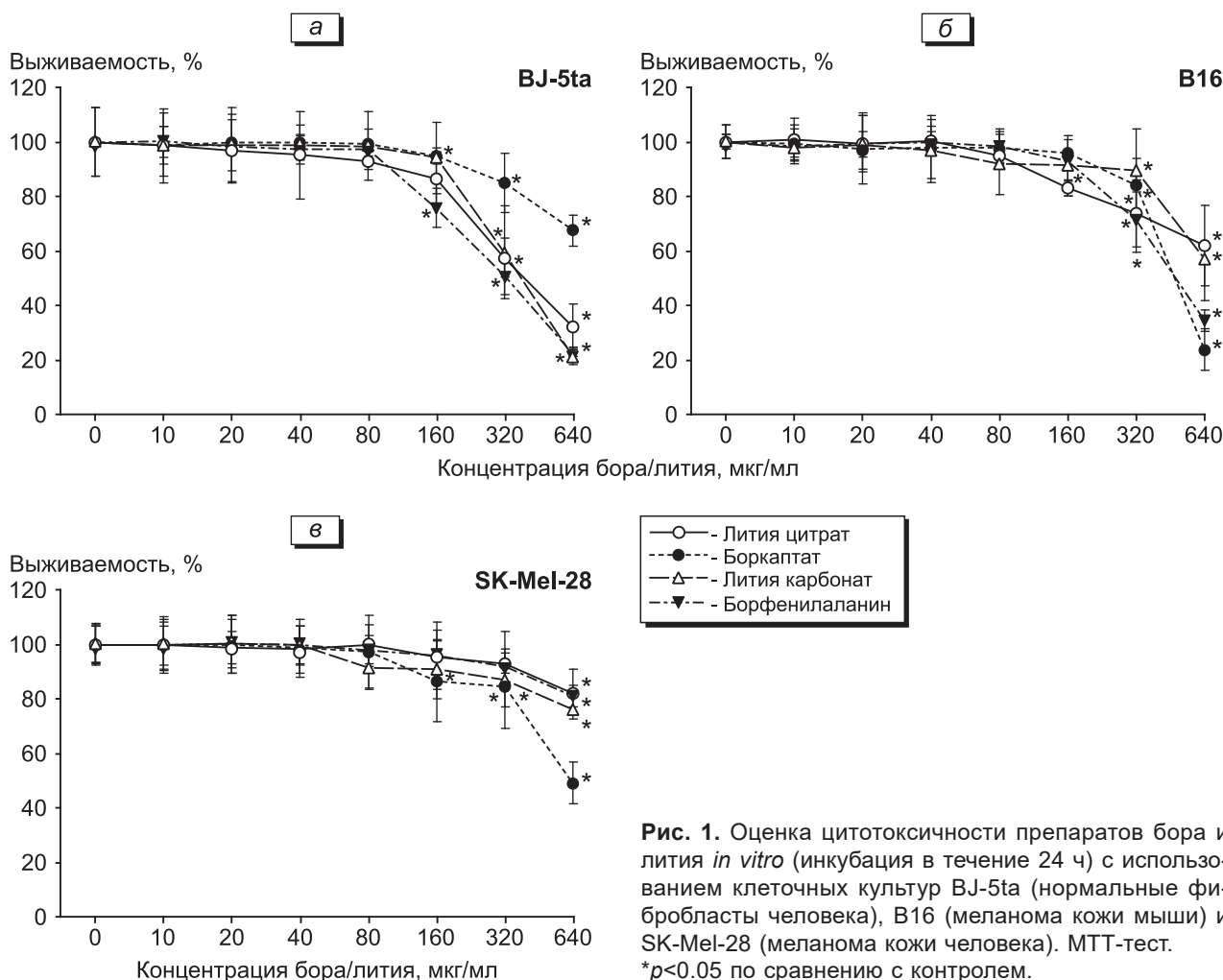


Рис. 1. Оценка цитотоксичности препаратов бора и лития *in vitro* (инкубация в течение 24 ч) с использованием клеточных культур VJ-5ta (нормальные фибробласты человека), B16 (меланома кожи мыши) и SK-Mel-28 (меланома кожи человека). МТТ-тест. **p*<0.05 по сравнению с контролем.

с данным препаратом при концентрации лития 160 мкг/мл значительно снижалась по сравнению с контролем. Таким образом, цитотоксичность исследованных солей лития значительно не отличалась от таковой у препаратов бора.

Накопление бора и лития нормальными и опухолевыми клетками определяли с помощью АЭС ИСП. Концентрация бора в клетках VJ-5ta составила 0.23 и 0.24 мкг/10⁶ клеток для борфенилаланина и боркаптата соответственно (рис. 2). Максимальная концентрация бора определялась в клетках SK-Mel-28 и B16 (0.29 мкг/10⁶ клеток) при инкубации с борфенилаланином. При введении боркаптата концентрация бора составила 0.21 мкг/10⁶ клеток для культуры SK-Mel-28 и 0.19 мкг/10⁶ клеток для B16. Концентрации лития в клетках VJ-5ta — 0.47 мкг/10⁶ клеток при инкубации с лития карбонатом и 0.12 мкг/10⁶ клеток при инкубации с лития цитратом. Накопление лития клетками SK-Mel-28 составляло 0.46 и 0.47 мкг/10⁶ клеток при инкубации с лития карбонатом и лития

цитратом соответственно. Наибольшая концентрация лития была выявлена в клетках B16 при инкубации с лития карбонатом (0.79 мкг/10⁶ клеток), при инкубации клеток с лития цитратом она составила 0.11 мкг/10⁶ клеток.

Полученные результаты накопления бора в опухолевых клетках согласуются с данными других исследований. Было показано, что концентрации бора в клетках глиомы варьировали в диапазоне 0.8-1.0 мкг/10⁷ клеток через 24 ч после введения борфенилаланина [12], а при исследовании трёх клеточных линий меланомы после инкубации с борфенилаланином в дозе 50 мкг/мл концентрации бора составляли 0.04-0.12 мкг/10⁶ клеток [13]. Введение борфенилаланина в концентрации 30 мкг/мл позволило достичь концентрации бора 0.2 мкг/10⁶ клеток глиобластомы человека T98G [14], при инкубации клеток опухоли с борфенилаланином в концентрации 50 мкг/мл — 1.7 мкг/10⁷ клеток U251 (глиома человека) и 3 мкг/10⁷ клеток SK-Mel-28 (меланома человека) [15]. Схожие

результаты были получены и при совместной инкубации клеток глиомы с 1 мМ боркаптата (0.86 мкг/10⁷ клеток) [16].

Ранее было показано, что Li⁺ поступает в клетку через Na⁺-зависимые каналы плазматической мембраны [17,18]. При инкубации С6 мышшиной глиомы с лития хлоридом в течение 60 мин была выявлена внутриклеточная концентрация лития 8 нмоль/10⁶ клеток; накопление клетками лития постепенно увеличивалось в течение последующих суток, что, по мнению исследователей, соответствует времени клинического ответа (10-14 дней) [10]. При проведении сравнительной оценки накопления лития клетками нейробластомы и глиомы человека были выявлены значительно более высокие концентрации лития в клетках глиомы (до 90 нмоль/мг белка через 40-60 мин инкубации с лития хлоридом) [11].

Кроме того, полученные данные выявили гетерогенное накопление бора и лития *in vitro*

при использовании препаратов бора и лития. Ранее показано, что накопление бора гетерогенно и зависит от клеточной линии даже в том случае, когда все линии принадлежат к одному гистологическому типу опухоли [13]. Известно, что внутриопухолевая гетерогенность клеток меланомы влияет на захват и накопление бора [19], 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. Наибольшие значения поглощения лития были получены на клетках мышшиной меланомы В16 при инкубации с лития карбонатом (0.79 мкг/10⁶ клеток); однако клетки SK-Mel-28 также активно накапливали как лития карбонат, так и лития цитрат (около 0.46 мкг/10⁶ клеток для двух типов солей лития). Фибробласты человека достаточно хорошо поглощали лития карбонат, при этом

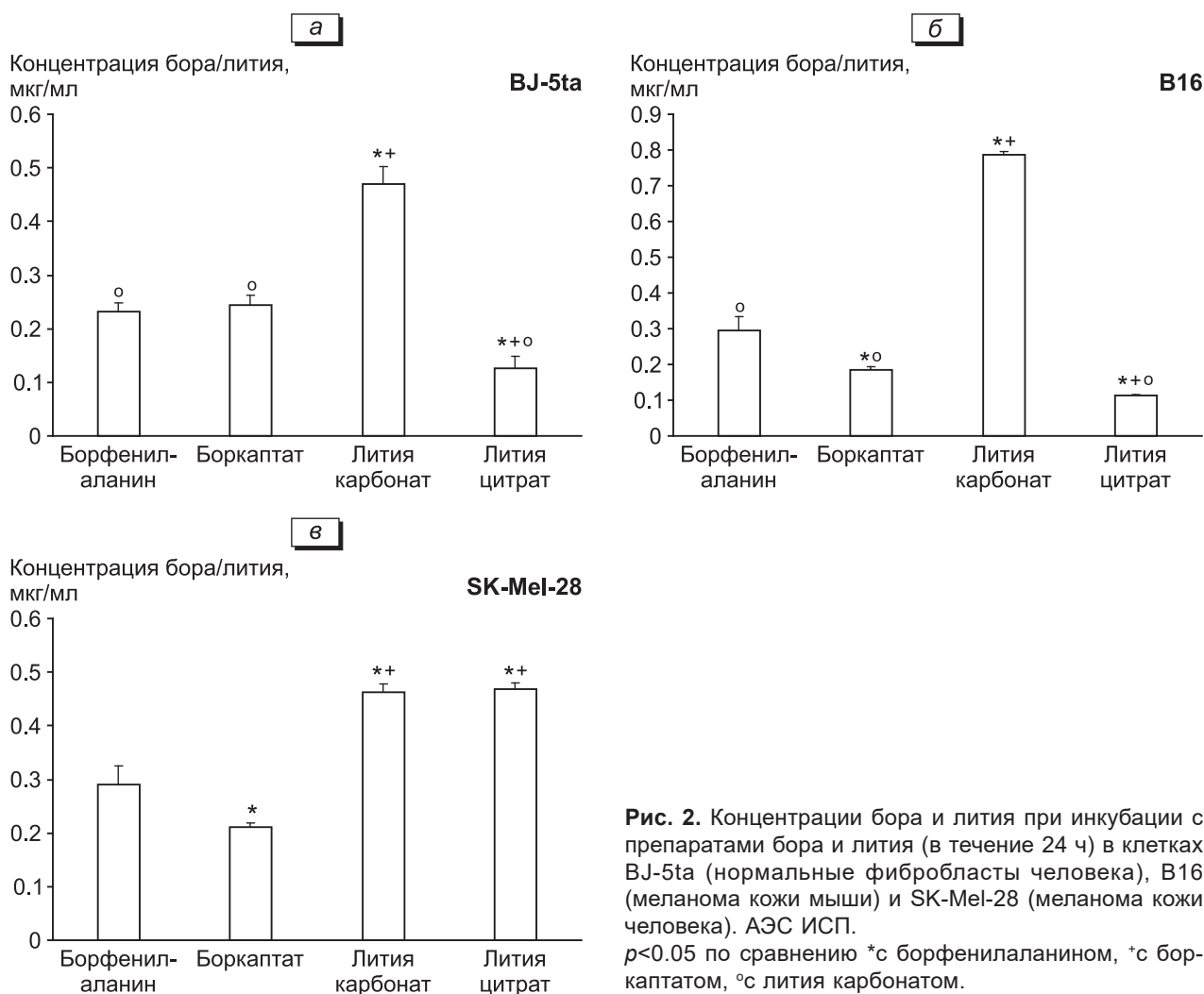


Рис. 2. Концентрации бора и лития при инкубации с препаратами бора и лития (в течение 24 ч) в клетках BJ-5ta (нормальные фибробласты человека), B16 (меланома кожи мыши) и SK-Mel-28 (меланома кожи человека). АЭС ИСП.

$p < 0.05$ по сравнению *с борфенилаланином, *с боркапнатом, °с лития карбонатом.

накопление лития цитрата было значительно более низким.

Полученные нами результаты свидетельствуют о значительно более высоком поглощении опухолевыми клетками лития (по сравнению с бором) при инкубации с одобренными для клинического применения препаратами бора, поэтому соли лития могут быть использованы для НЗТ.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант № 19-72-30005, <https://rscf.ru/project/19-72-30005/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Neutron capture therapy: principles and applications* / Eds W.Sauerwein, A.Wittig, R.Moss, Y.Nakagawa. Berlin, 2012. doi: 10.1007/978-3-642-31334-9
2. *Asbury A.K., Ojemann R.G., Nielsen S.L., Sweet W.H.* Neuropathologic study of fourteen cases of malignant brain tumor treated by boron-10 slow neutron capture radiation // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1972. Vol. 31, N 2. P. 278-303. doi: 10.1097/00005072-197204000-00005
3. *Nakagawa Y., Pooh K., Kobayashi T., Kageji T., Uyama S., Matsumura A., Kumada H.* Clinical review of the Japanese experience with boron neutron capture therapy and a proposed strategy using epithermal neutron beams // *J. Neurooncol.* 2003. Vol. 62, N 1-2. P. 87-99. doi: 10.1007/BF02699936
4. *Vos M.J., Turowski B., Zanella F.E., Paquis P., Siefert A., Hideghéty K., Haselsberger K., Grochulla F., Postma T.J., Wittig A., Heimans J.J., Slotman B.J., Vandertop W.P., Sauerwein W.* Radiologic findings in patients treated with boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme within EORTC trial 11961 // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2005. Vol. 61, N 2. P. 392-399. doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.06.008
5. *Kankaanranta L., Seppälä T., Koivunoro H., Välimäki P., Beule A., Collan J., Kortensniemi M., Uusi-Simola J., Kotiluoto P., Auterinen I., Serén T., Paetau A., Saarilahti K., Savolainen S., Joensuu H.* L-boronophenylalanine-mediated boron neutron capture therapy for malignant glioma progressing after external beam radiation therapy: a Phase I study // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2011. Vol. 80, N 2. P. 369-376. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.02.031
6. *Barth R.F., Mi P., Yang W.* Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer // *Cancer Commun (Lond).* 2018. Vol. 38, N 1. ID 35. doi: 10.1186/s40880-018-0299-7
7. *Wang S., Zhang Z., Miao L., Li Y.* Boron neutron capture therapy: current status and challenges // *Front. Oncol.* 2022. Vol. 12. ID 788770. doi: 10.3389/fonc.2022.788770
8. *Barth R.F., Vicente M.G., Harling O.K., Kiger W.S.3rd, Riley K.J., Binns P.J., Wagner F.M., Suzuki M., Aihara T., Kato I., Kawabata S.* Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer // *Radiat. Oncol.* 2012. Vol. 7. ID 146. doi: 10.1186/1748-717X-7-146
9. *Ailuno G., Balboni A., Caviglioli G., Lai F., Barbieri F., Dellacasagrande I., Florio T., Baldassari S.* Boron vehiculating nanosystems for neutron capture therapy in cancer treatment // *Cells.* 2022. Vol. 11, N 24. ID 4029. doi: 10.3390/cells11244029
10. *Gorkin R.A., Richelson E.* Lithium ion accumulation by cultured glioma cells // *Brain Res.* 1979. Vol. 171, N 2. P. 365-368. doi: 10.1016/0006-8993(79)90344-5
11. *Saneto R.P., Perez-Polo J.R.* Differences in the accumulation of lithium in human neuroblastoma and glioma cells in tissue culture // *J. Neurosci. Res.* 1982. Vol. 7, N 4. P. 413-418. doi: 10.1002/jnr.490070407
12. *Yoshida F., Kurita T., Endo K., Nakai K., Shirakawa M., Zaboronok A., Tsurubuchi T., Ishikawa E., Matsumura A.* Difference in BPA uptake between glioma stem-like cells and their cancerous cells // *Appl. Radiat. Isot.* 2020. Vol. 164. ID 109234. doi: 10.1016/j.apradiso.2020.109234
13. *Carpano M., Perona M., Rodriguez C., Nievas S., Olivera M., Santa Cruz G.A., Brandizzi D., Cabrini R., Pisarev M., Juvenal G.J., Dagrosa M.A.* Experimental studies of boronophenylalanine ((10)BPA) biodistribution for the individual application of boron neutron capture therapy (BNCT) for malignant melanoma treatment // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2015. Vol. 93, N 2. P. 344-352. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.05.039
14. *Wada Y., Hirose K., Harada T., Sato M., Watanabe T., Anbai A., Hashimoto M., Takai Y.* Impact of oxygen status on 10B-BPA uptake into human glioblastoma cells, referring to significance in boron neutron capture therapy // *J. Radiat. Res.* 2018. Vol. 59, N 2. P. 122-128. doi: 10.1093/jrr/rrx080
15. *Касатова А.И., Каныгин В.В., Разумов И.А., Таскаев С.Ю., Касатов Д.А., Бывальцев В.А.* Исследование биологической эффективности бор-нейтронзахватной терапии на клетках глиомы и меланомы человека // *Патол. физиол. и эксперим. тер.* 2020. Т. 64, № 3. С. 110-116. doi: 10.25557/0031-2991.2020.03.110-116
16. *Futamura G., Kawabata S., Nonoguchi N., Hiramatsu R., Toho T., Tanaka H., Masunaga S.I., Hattori Y., Kirihata M., Ono K., Kuroiwa T., Miyatake S.I.* Evaluation of a novel sodium borocaptate-containing unnatural amino acid as a boron delivery agent for neutron capture therapy of the F98 rat glioma // *Radiat. Oncol.* 2017. Vol. 12, N 1. ID 26. doi: 10.1186/s13014-017-0765-4

17. Oruch R., Elderbi M.A., Khattab H.A., Pryme I.F., Lund A. Lithium: a review of pharmacology, clinical uses, and toxicity // *Eur. J. Pharmacol.* 2014. Vol. 740. P. 464-473. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.06.042
18. Vosahlikova M., Svoboda P. Lithium — therapeutic tool endowed with multiple beneficiary effects caused by multiple mechanisms // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 2016. Vol. 76, N 1. P. 1-19. doi: 10.21307/ane-2017-001
19. Rossini A.E., Dargosa M.A., Portu A., Saint Martin G., Thorp S., Casal M., Navarro A., Juvenal G.J., Pisarev M.A. Assessment of biological effectiveness of boron neutron capture therapy in primary and metastatic melanoma cell lines // *Int. J. Radiat. Biol.* 2015. Vol. 91, N 1. P. 81-89. doi: 10.3109/09553002.2014.942013

Получено 13.03.24

