

Касатова Анна Исмагиловна

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

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте клинической и экспериментальной лимфологии – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук

Таскаева Юлия Сергеевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Коваль Ольга Александровна

(Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория биотехнологии, ведущий научный сотрудник)

доктор медицинских наук, профессор

Трунов Александр Николаевич

(Федеральное государственное автономное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С. Н. Федорова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Новосибирский филиал), научный отдел, руководитель отдела)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2024 г. в «_____» часов на заседании диссертационного совета 21.2.046.05, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; тел.: (383)2291083).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52; <http://www.ngmu.ru/dissertation/4240>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Bonì V. et al., 2020; Sung H. et al., 2021; Wang S et al., 2021; Upadhaya S. et al., 2022; Winstead E. et al., 2022; Dennis M. et al., 2023). 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 (Jin S. et al., 2022; Winstead E. et al., 2022; Dennis M. et al., 2023; Helwick C. et al., 2023).

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 (Таскаев С. Ю., Каныгин В. В. 2016.; Sauerwein W. A. G. et al., 2012). БНЗТ активно используется для лечения глиобластомы, меланомы, злокачественных новообразований головы и шеи, а также рецидивирующих опухолей молочной железы и отдаленных метастазов (Kawabata S., 2009; Zonta A., 2009; Horiguchi H., 2011; Kageji T., 2014; Hiratsuka J., 2020; Hiratsuka J., 2018; Takeuchi K., 2018; Koivunoro H., 2019; Hirose K., 2021).

Достижение оптимальных концентраций бора в опухолевых клетках является важнейшей проблемой, сдерживающей дальнейшее развитие и эффективное использование БНЗТ при лечении пациентов с различными онкологическими заболеваниями (Sauerwein W. A. G. et al., 2021; Jin W. H. A., 2022; Cheng X., 2022). 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 характеризуются высокой линейной передачей энергии (Sauerwein W. A. G. et al., 2012).

Более успешное, по сравнению с бором, использование лития, однако, характеризуется относительно узким терапевтическим диапазоном, при этом повышается вероятность развития его токсических эффектов (Pérez-Castelló I. et al., 2016). 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 (Baird-Gunning J., 2017; Łukawska E., 2021). При этом, возможно формирование терминальной стадии хронической почечной недостаточности, развитие которой может наблюдаться у 1,5 % пациентов,

получающих терапию литием (Łukawska E., 2021). Другой литий-ассоциированной патологией является формированием хронической тубулоинтерстициальной нефропатии, а также нефротического синдрома (Baird-Gunning J., 2017). 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 (Wen J. et al., 2019; Kakhki S., Ahmadi-Soleimani S. M., 2022).

В связи с вышеизложенным, на современном этапе для безопасного применения препаратов лития при проведении 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 (Sauerwein W. A. G. et al., 2012). Единичные экспериментальные работы были проведены в период до 1956 года (Zahl P., 1941; Luessenhop A. J. et al., 1956), 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 (Rendina L. M., 2010).

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 (меланома кожи), и в органах, отдаленных от опухолевого роста: крови, 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 структуры и ультраструктуры почки и анализ экспрессии белков-маркеров острого повреждения Kim1 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. Экспериментальное исследование *in vitro* проведено 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 НЗТ, 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 В16 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, 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.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты диссертационного исследования внедрены в работу лаборатории РНФ-104 и сектора 9-21, которая направлена на

практическую реализацию методики лечения злокачественных опухолей на источнике эпитепловых нейтронов ускорительного типа в ИЯФ СО РАН, а также внедрены в лекционный курс кафедры ядерной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (г. Новосибирск).

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.

Объем и структура диссертации. 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. б. н., профессора, заведующей лабораторией ультраструктурных исследований НИИКЭЛ Н. П. Бгатовой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали клеточную культуру меланомы кожи мыши В16, полученную в Институте цитологии и генетики СО РАН. Клеточные культуры меланомы кожи человека SK-Mel-28 и дермальные фибробласты человека VJ-5ta получены в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН. Все клеточные культуры культивировали на среде DMEM/F12 с содержанием 10 % фетальной бычьей сыворотки и антибиотика гентамицина 50 мкг/мл при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе. Пересевали клетки, используя раствор трипсин-версен, 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.

МТТ-тест. Цитотоксичность препаратов бора и лития определяли при помощи МТТ-теста. Клетки высевали в 96-луночный планшет по 4×10^4 клеток на лунку. Затем в лунки добавляли препараты бора и лития в диапазоне концентраций элементов в растворе от 10 до 640 мкг/мл. В качестве контрольных групп использовали лунки с клетками со средой без препаратов. Через 24 часа в каждую лунку добавляли 10 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл и 100 мкл среды без сыворотки. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 595 нм. Выживаемость клеток рассчитывали, использовали формулу:

Выживаемость (%) = $\text{ОПоп.} / \text{ОПКонт.} \times 100 \%$, где ОПоп – оптическая плотность в опытной группе, ОПКонт – оптическая плотность в контрольной группе.

Клоногенный анализ. Анализ влияния препаратов лития на пролиферативную активность клеток проводили при помощи клоногенного анализа. Клетки инкубировали с препаратами лития с конечной концентрацией лития в культуральной среде 40 мкг/мл в течение 24 часов, контрольные группы культивировали без препаратов. Затем проводили подсчет при помощи автоматического счетчика клеток Countess Cell Count (Invitrogen, США) и высевали по 200 клеток на лунку 6-луночного культурального планшета по 3 повтора для каждой экспериментальной группы. Когда количество клеток в колонии достигало 50, колонии фиксировали 10 % раствором формалина (Panreac AppliChem, Германия), окрашивали раствором Гимза (Sigma, США) и подсчитывали визуально при помощи светового инвертированного микроскопа Zeiss Primo Vert (Zeiss, Германия). Долю выживших клеток в опытных группах рассчитывали с учетом выживаемости в контроле, используя формулу:

Доля выживших клеток (%) = $\text{Коп.} / \text{Кконт.} \times 100 \%$, где Коп – среднее количество колоний в опытной группе, Кконт – среднее количество колоний в контрольной группе.

Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (АЭС ИСП)

Для анализа концентрация бора и лития в клетках использовали атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой (АЭС ИСП). Клетки инкубировали во флаконах с площадью поверхности 25 см^2 в течение 24 часов, затем среду меняли на среду, 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 озоления с использованием концентрированной азотной кислоты HNO_3 (х.ч., Panreac AppliChem, Германия) при

температуре 90 °С в системе нагревания Dry Block Heater 2 (ИКА, Германия). Измерение концентрации бора и лития проводили на спектрометре высокого разрешения ICPE-9820 (Shimadzu, Япония). Градуировочные зависимости строили с использованием одноэлементного стандартного раствора бора Boron Standart for ICP (Sigma-Aldrich, США) или лития Lithium Single Element Std. Soln. for ICP (Central Drug House (P) Ltd, Индия) в диапазоне 0,01–10 мг/л. Для получения итоговой концентрации бора или лития в клетках использовали формулу: измеренная концентрация × объем образца / количество клеток × 10⁶.

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 °С и световом режиме свет/темнота 12/12, на стандартной диете, вода и пища животным предоставлялись *ad libitum*. 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, от 27 февраля 2020 г.). Для моделирования опухолевого процесса использовали клеточную культуру меланомы кожи мыши В16. Каждому животному инокулировали суспензию, содержащую 10 млн клеток В16 подкожно в правую паховую область. Когда целевой объем опухоли достигал 100 мкл, животных разделили на 11 групп (по 5 мышей в каждой): контрольная группа, 5 групп получавшие лития карбонат в дозе 300 мг/кг и 5 групп получавшие 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.

Анализ биораспределения лития. Для измерения концентрации лития в опухоли, коже, крови, почке и головном мозге использовали метод АЭС ИСП. К навеске с заранее известной массой добавляли концентрированную азотную кислоту HNO₃ (х. ч., 69 %), перекись водорода H₂O₂ (37 %) и использовали систему Dry Block Heater 2 (ИКА, Германия), в которой пробы нагревали до температуры 90 °С до 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 опухолях и органах использовали формулу: измеренная концентрация \times объем образца / вес органа.

Световая микроскопия и ШИК-реакция. Для исследования методом световой микроскопии образцы почки фиксировали в 4 % растворе параформальдегида, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации, обезжировали в ксилоле и заливали в парафин по общепринятой гистологической методике (Волкова О. В., 1982). 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. Парафиновые срезы почки были окрашены с использованием периодической кислоты Шиффа (ШИК-реакция). Морфология почки оценивалась путем анализа специфического окрашивания гликогена с помощью компьютерной программы ImageJ (Wayne Rasband, США).

Трансмиссионная электронная микроскопия. Для исследования в электронном микроскопе фрагменты почки размером до 1мм³ фиксировали в 4 % растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 часа в 1 % растворе OsO₄ на фосфатном буфере, дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в 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.

Иммуногистохимия. Для иммуногистохимического исследования образцы почки фиксировали в 4 %-ном 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 Kim1 (Cloud-clone corp., Китай) в течение ночи при +4 °C и далее с соответствующими вторичными поликлональными антителами козла к IgG кролика (Abscam, Великобритания), конъюгированными с пероксидазой хрена в течение 1 ч при +25 °C. После гибридизации, срезы отмывали, контрастировали раствором гематоксилина, дегидратировали и заключали в монтирующую среду. Изображения получали на микроскопе 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.

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 фенестр 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 (Taskaeva I. et al., 2022). Интенсивность и процент положительного окрашивания цитоплазмы оценивали по бальной 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 Kim1 и NGAL рассчитывали по формуле: площадь \times 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 ($M - \text{mean}$) и стандартного отклонения ($SD - \text{standard deviation}$) в виде $M \pm SD$. Для попарного сравнения независимых групп использовали U-критерий Манна – Уитни (непараметрическая статистика). Различия считали значимыми при уровне достоверности 95 % ($P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка цитотоксичности препаратов бора и лития на клетках меланомы. С помощью МТТ-теста оценивали жизнеспособность клеточных культур при введении препаратов бора и лития в широком диапазоне концентраций. Для линии дермальных фибробластов VJ-5ta токсическая концентрация ^{10}B составила 160 мкг/мл при инкубации с борфенилаланином и боркаптатом, в то время как при инкубации клеток этой линии с солями лития токсическая концентрация лития была в 2 раза выше и составила 320 мкг/мл. Было обнаружено, что клеточная культура SK-Mel-28 устойчива к высоким дозам борфенилаланина и боркаптата, достоверное снижение жизнеспособности происходило только при воздействии ^{10}B в концентрации 640 мкг/мл. Цитотоксический эффект был обнаружен при инкубации этой культуры с лития карбонатом и лития хлоридом с концентрацией лития 320 мкг/мл, а при инкубации с лития цитратом – с концентрацией 160 мкг/мл. Цитотоксическое действие борфенилаланина на клеточную культуру V16 было впервые выявлено при концентрации ^{10}B – 320 мкг/мл, боркаптата – при концентрации ^{10}B – 160 мкг/мл. Выживаемость клеток V16 статистически значимо снизилась относительно контроля при воздействии солей лития в концентрации лития 320 мкг/мл. В результате клоногенного анализа, проведенного после инкубации клеток с солями лития в концентрации лития 40 мкг/мл в течение 24 часов, не было выявлено достоверных отличий между долей выживших клеток в опытных и контрольных группах. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что препараты бора и лития не оказывают цитотоксического эффекта в концентрациях, требуемых для успешной нейтронозахватной реакции и могут быть использованы в дальнейших экспериментах.

Анализ накопления бора в клетках меланомы. Концентрации бора и лития в клетках определяли при помощи АЭС ИСП (Рисунок 1). Полученные результаты показали гетерогенное накопление бора и лития *in vitro*. Наибольшие значения поглощения лития были получены на клетках меланомы мыши V16 при инкубации с лития карбонатом ($0,79 \text{ мкг}/10^6$ клеток); однако клетки меланомы человека SK-Mel-28 активно накапливали как лития карбонат, также и лития цитрат (около $0,46 \text{ мкг}/10^6$ клеток для обеих солей). Концентрация лития в нормальных фибробластах человека составила $0,47 \text{ мкг}/10^6$ клеток при инкубации с лития карбонатом. Накопление лития всеми клеточными культурами было значительно более низким при

инкубации с лития хлоридом. Более эффективное накопление бора клетками происходило при инкубации с борфенилаланином и составило $0,29 \text{ мкг}/10^6$ клеток для обеих культур меланомы. Накопление бора дермальными фибробластами VJ-5ta достоверно не зависело от препарата и составило $0,23\text{--}0,24 \text{ мкг}/10^6$ клеток. Таким образом, полученные результаты демонстрируют значительно более высокое поглощение опухолевыми клетками лития, в сравнении с бором, при инкубации с одобренными для клинического применения препаратами.

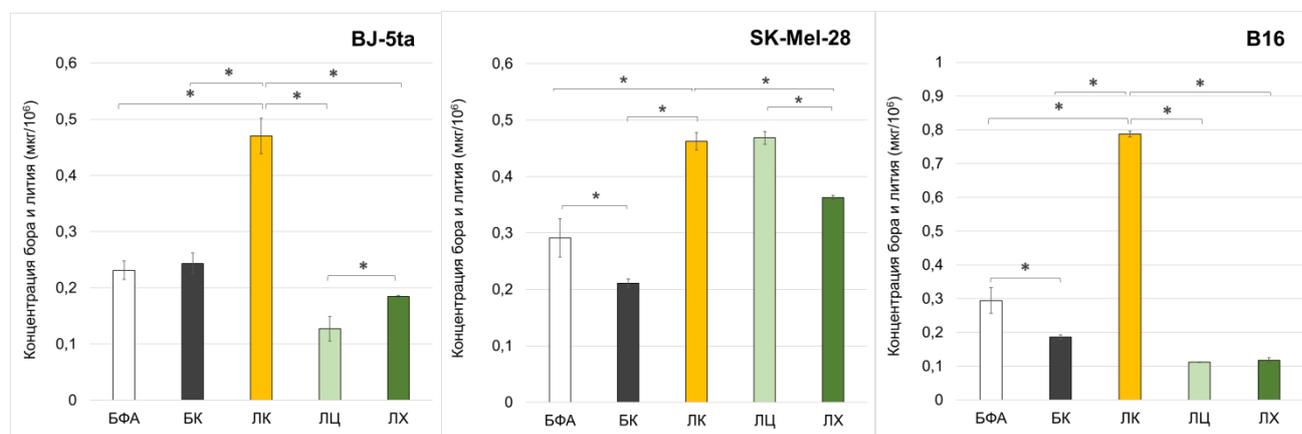


Рисунок 1 – Анализ концентраций бора и лития в клетках VJ-5ta, SK-Mel-28 и B16 через 24 часа инкубации с препаратами бора и солями лития. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 3$).

* $p < 0,05$. БФА – борфенилаланин, БК – боркапнат, ЛК – лития карбонат, ЛЦ – лития цитрат, ЛХ – лития хлорид.

Изучение биораспределения лития в опухоли, коже, крови, почках, головном мозге. Измерение содержания лития в динамике в опухоли, коже, крови, почках и головном мозге проводили при помощи метода АЭС ИСП (Рисунок 2 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 2 В, Г).

Эффективность накопления лития в опухоли была наиболее высокой на временной точке 30 мин в группе ЛК-400 и составила $(22,4 \pm 4,9) \text{ мкг}/\text{г}$. Соотношение опухоль/кожа на этой временной точке составило 1,5; соотношение опухоль/кровь – 2. 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 пробах 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 органах и тканях снизилась до фоновых значений через 7 суток после однократного введения лития карбоната, что говорит о полной элиминации лития из организма.

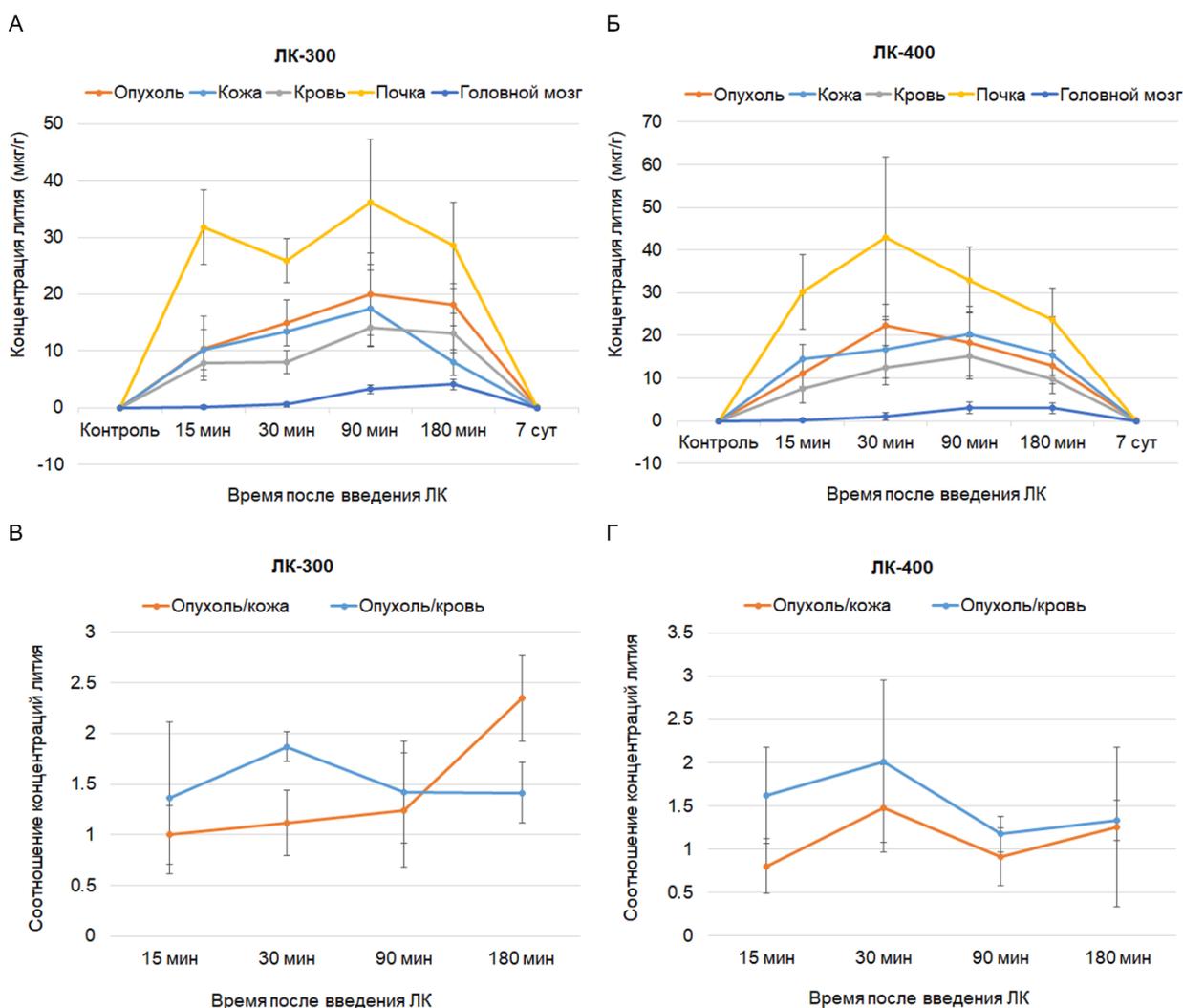


Рисунок 2 – Результаты исследования биораспределения лития в опухоли и органах интереса (А, Б) и соотношение концентраций лития опухоль/кожа и опухоль/кровь (В, Г) в динамике после однократного перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300) (А, В) и 400 мг/кг (ЛК-400) (Б, Г) мышам с имплантированной меланомой В16.

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

Оценка веса животных. Было выявлено незначительное снижение веса тела мышей, получивших лития карбонат, однако статистически значимых различий между опытными группами и контрольной группой обнаружено не было.

Оценка структурных изменений почки при введении лития карбоната. 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. Через 30 минут после введения лития

карбоната отмечали прогрессирующее повреждение эпителия проксимальных канальцев с частичной его десквамацией. Наиболее выраженные структурные 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 (Рисунок 3 А, Б). Через 7 суток после введения лития карбоната наблюдали восстановление эпителия проксимальных канальцев.

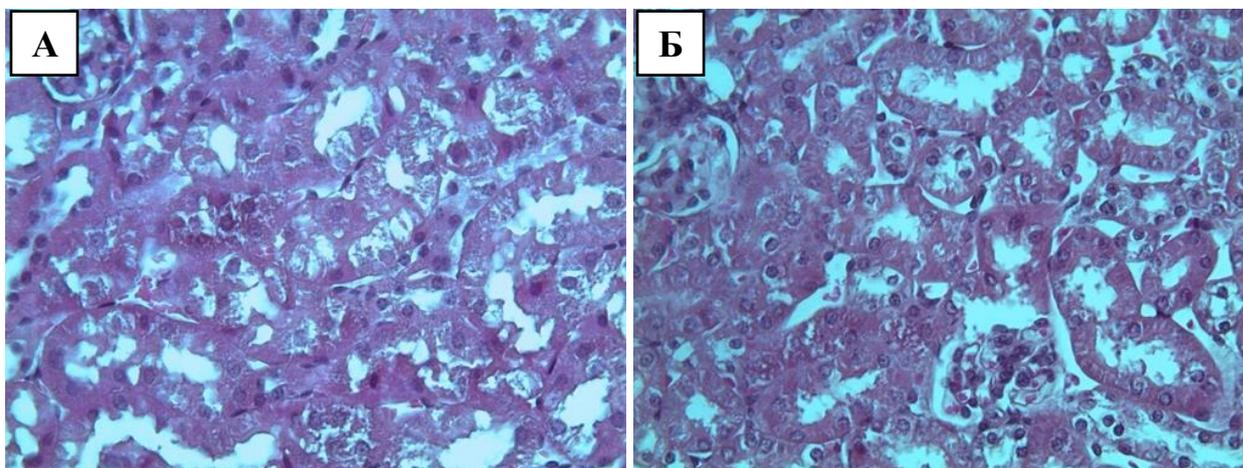


Рисунок 3 – Структура эпителия проксимальных канальцев через 90 мин (А) и 7 суток (Б) после перорального введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

Анализ повреждения почек при введении лития карбоната с учетом данных ШИК-реакции. Лития карбонат в дозах 300 мг/кг и 400 мг/кг при однократном введении не приводили 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.

Ультраструктурная организация фильтрационного барьера и проксимального отдела почки. Для оценки компонентов фильтрационного барьера почки было выполнено электронно-микроскопическое исследование ножек подоцитов, гломерулярной базальной мембраны и эндотелиоцитов гломерулярных капилляров, значимых изменений при оценке данных структур выявлено не было. Был выполнен анализ ультраструктуры апикальной, околядерной и базальной зон эпителиоцитов проксимальных канальцев, обнаруженные изменения, такие как структурные признаки набухания цитоплазмы, снижение содержания эндосом и плотных апикальных канальцев, появление единичных зон деструкции в отдельных эпителиоцитах были выявлены на временных точках 15–180 минут (Рисунок 4 А, Б и В). Через

7 суток после введения лития карбоната содержание эндосом и плотных апикальных канальцев в эпителиоцитах соответствовало их количеству в контрольной группе, сохранялись зоны набухания цитоплазмы отдельных эпителиоцитов (Рисунок 4 Г).

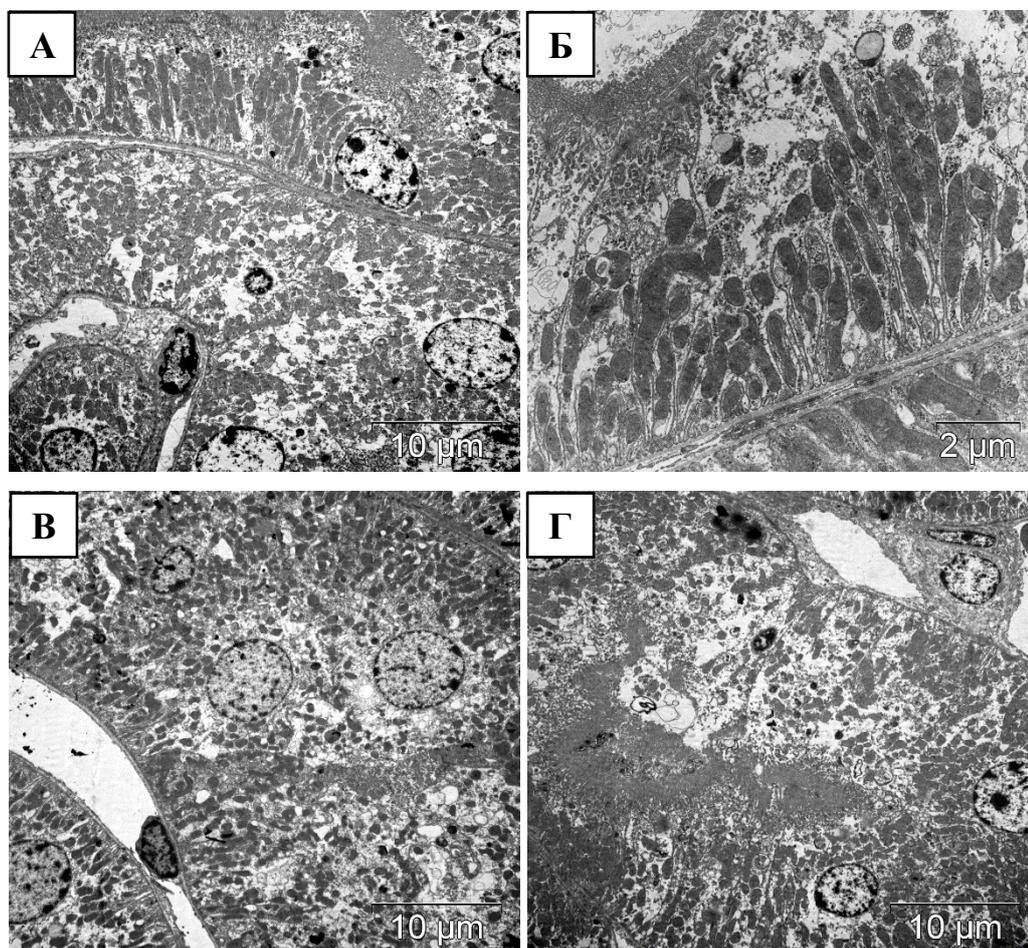
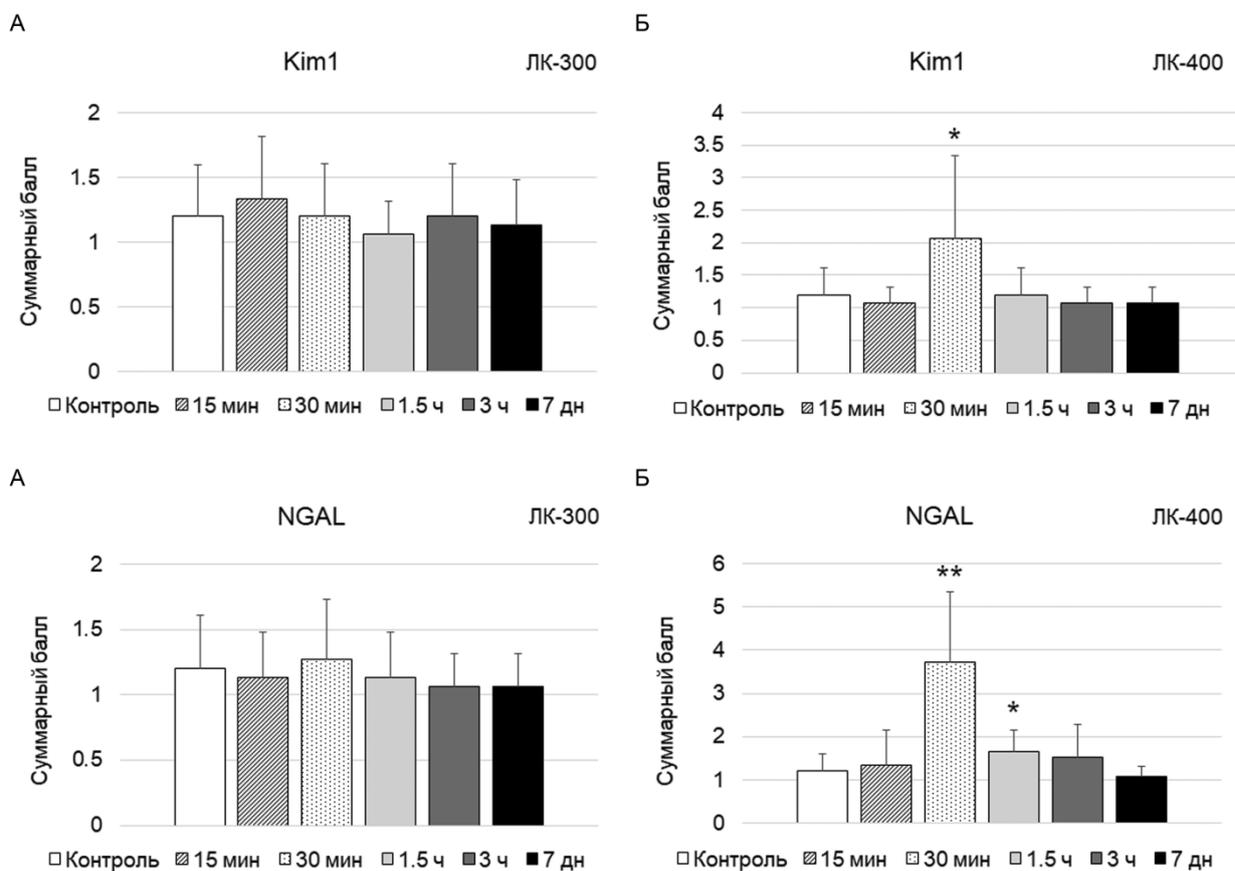


Рисунок 4 – Структура эпителиоцитов проксимальных канальцев в контрольной группе (А) у мышей с отдаленным опухолевым ростом и через 30 (Б), 180 (В) мин и 7 суток (Г) после введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг

В результате морфометрического анализа достоверных различий между контрольной группой и опытными группами, получавшими лития карбонат однократно в дозах 300 мг/кг и 400 мг/кг 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.

Оценка экспрессии белков-маркеров острого повреждения почек Kim1 и NGAL.

Определение результатов 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 маркеры Kim1 и NGAL представлены на Рисунке 5.



Примечание: * – различия статистически значимы в сравнении с контрольной группой (U-критерий Манна – Уитни; * $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$).

Рисунок 5 – Оценка результатов иммуногистохимического окрашивания срезов почки на маркеры острого повреждения почек Kim1 и NGAL в динамике после перорального введения лития карбоната в дозе 300 мг/кг (ЛК-300, А) и 400 мг/кг (ЛК-400, Б).

Данные представлены как $M \pm SD$

Достоверных отличий в уровнях экспрессии белков-маркеров Kim1 и NGAL при введении лития карбоната в дозе 300 мг/кг по сравнению с контрольными группами выявлено не было. Отмечалось повышение уровня экспрессии Kim1 в 1,7 раза через 30 минут после введения лития карбоната в дозе 400 мг/кг. На более поздних временных точках эксперимента уровни экспрессии этого белка соответствовали показателям в контрольной группе. Уровни экспрессии 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. На более поздних временных

точках эксперимента (180 минут и 7 дней) уровни экспрессии NGAL соответствовали показателям в контрольной группе.

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 $0,45 \text{ мкг}/10^6$ в сравнении с концентрацией бора – $0,29 \text{ мкг}/10^6$;

б) меланома кожи мыши (B16): концентрация лития в клетках составила $0,79 \text{ мкг}/10^6$ в сравнении с концентрацией бора – $0,29 \text{ мкг}/10^6$.

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 *in vivo* 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 гистологии, патологической анатомии и фармакологии медицинских вузов РФ. Кроме того, полученные новые данные могут быть внедрены в лекционный курс кафедры ядерной медицины для подготовки специалистов в области бинарных методов лучевой терапии, в частности нейтронозахватной терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Study of Lithium Biodistribution and Nephrotoxicity in Skin Melanoma Mice Model: The First Step towards Implementing Lithium Neutron Capture Therapy / I. Taskaeva, **A. Kasatova**, D. Surodin [et al.]. – Текст : электронный // **Life**. – 2023. – Vol. 13, N. 2. – P. 518. – URL: <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/2/518>. – Дата публикации: 14.02.2023.

2. Оценка экспрессии белков-маркеров острого повреждения почек Kim1 и NGAL после введения высоких доз лития карбоната у мышей с имплантированной меланомой кожи B16 / Ю. С. Таскаева, **А. И. Касатова**, А. Ю. Шатрук [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2023. – Т. 176, № 11. – С. 579–584.

3. Lithium salts cytotoxicity and accumulation in melanoma cells in vitro / I. Taskaeva, **A. Kasatova**, I. Razumov [et al.]. – **Journal of Applied Toxicology**. – 2023. – P. 1–8.

4. Lithium as a promising therapeutic agent for Neutron Capture Therapy / Yu. Taskaeva, **A. Kasatova**, D. Surodin, N. Bgatova, S. Taskaev. Book of Abstracts of the 4th All-Russian School of Young Scientists on BNCT 11-12 July 2022, Novosibirsk. p. 29.

5. Lithium neutron capture therapy as a new strategy for cancer treatment / **A. Kasatova**. Iu. Taskaeva, D. Surodin [et al.] // International Scientific Conference «Innovative Technologies of Nuclear Medicine and Radiation Diagnostics and Therapy». – Moscow, 2022. – P. 55–56.

6. Lithium neutron capture therapy as a potential melanoma treatment modality / Iu. Taskaeva, **A. Kasatova**, D. Surodin [et al.] // 11 Young Researchers BNCT Meeting. – Virtual congress, 2022. – P. 75.

7. Оценка цитотоксичности и накопления различных солей лития в клетках меланомы кожи SK-Mel-28 и B16 / **А. И. Касатова**, Ю. С. Таскаева, И. А. Разумов [и др.] // Алмазовский молодежный медицинский форум-2023, состоявшийся в рамках VI Инновационного Петербургского медицинского форума: Трансляционная медицина – Санкт-Петербург, 2023. – С. 422–423.

8. Перспективность использования лития в нейтронозахватной терапии: анализ биораспределения и нефротоксичности лития на мышинной модели меланомы кожи / Ю. С. Таскаева, **А. И. Касатова**, Н. П. Бгатова [и др.] // Алмазовский молодежный медицинский форум-2023, состоявшийся в рамках VI Инновационного Петербургского медицинского форума: Трансляционная медицина – Санкт-Петербург, 2023. – С. 424.

9. Lithium for neutron capture therapy: the current state and perspectives / **A. Kasatova**, Iu. Taskaeva, N. Bgatova [et al.] // II International Scientific Conference «Innovative Technologies of Nuclear Medicine and Radiation Diagnostics and Therapy». – Moscow, 2023. – P. 53–54.

10. Cytotoxicity and accumulation of boron and lithium in melanoma cells: a comparative study in vitro / Iu. Taskaeva, **A. Kasatova**, I. Razumov [et al.] // II International Scientific Conference «Innovative Technologies of Nuclear Medicine and Radiation Diagnostics and Therapy». – Moscow, 2023. – P. 96–67.

11. Lithium-Neutron Capture Therapy / N. Bgatova, Iu. Taskaeva, **A. Kasatova** [et al.] // 5th All-Russian School of Young Scientists on BNCT. – Novosibirsk, 2023. – P. 6.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЭС ИСП	– атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
БНЗТ	– бор-нейтронозахватная терапия
ДМСО	– диметилсульфоксид
ЛиНЗТ	– литий-нейтронозахватная терапия
МТТ	– тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид
НЗТ	– нейтронозахватная терапия
DMEM/F-12	– модифицированная Дульбекко среда Игла в сочетании со средой Хэма
Kim1	– трансмембранный белок, экспрессия которого повышается в проксимальных канальцах при остром повреждении почки
M	– среднее значение
SD	– стандартное отклонение
NGAL	– белок, экспрессия которого повышается в почечных канальцах при остром повреждении почки

