
ОНКОЛОГИЯ

ЭФФЕКТЫ БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ НА РОСТ ПОДКОЖНЫХ КСЕНОГРАФТОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА SW-620 У ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ

В.В.Каныгин¹, А.И.Касатова^{1,2}, Е.Л.Завьялов^{1,3}, И.А.Разумов^{1,3},
С.И.Колесников^{4,5}, А.И.Кичигин¹, О.И.Соловьева^{1,3}, А.Р.Цыганкова^{1,6},
С.Ю.Таскаев^{1,2}, Д.А.Касатов^{1,2}, Т.В.Сычева^{1,2}, В.А.Бывальцев^{7,8}

¹ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, РФ; ²ФГБНУ Институт ядерной физики им. Г.И.Будкера СО РАН, Новосибирск, РФ; ³ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, РФ; ⁴ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, РФ; ⁵МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ; ⁶ФГБНУ Институт неорганической химии им. А.В.Николаева СО РАН, Новосибирск, РФ; ⁷ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России, Иркутск; ⁸ФГБОУ ДПО Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования Минздрава России, Иркутск

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) может стать одним из инструментов лечения злокачественных новообразований прямой и толстой кишки. Оценивали эффективность БНЗТ, проводимой на источнике эпитепловых нейтронов ускорительного типа в Институте ядерной физики им. Г.И.Будкера СО РАН, в отношении подкожных ксенографтов аденокарциномы толстой кишки человека SW-620 у мышей линии SCID. Применение БНЗТ с борфенилаланином (BPA) и боркаптатом (BSH), которые вводили внутривенно в ретроорбитальный синус, достоверно уменьшало объёмы опухолей по сравнению с контрольной группой (без облучения).

Ключевые слова: бор-нейтронозахватная терапия; ускорительный источник эпитепловых нейтронов; борфенилаланин; боркаптат; колоректальная аденокарцинома человека

Одним из перспективных подходов к лечению колоректального рака является бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) [6]. Так, исследователи из Аргентины обнаружили достоверное преимущество метода БНЗТ с борфенилаланином (BPA), проведённой на реакторе RA-3, перед гамма-излучением в экспериментах на сублинии клеток колоректальной аденокарциномы

человека [5]. В доклинических исследованиях на мышцах линии BALB/c с подкожно имплантированными клетками линии Colon 26 (колоректальная карцинома мыши) был показан регресс опухоли с её полным исчезновением и 100% выживаемость после проведения БНЗТ на реакторе TRIGA-II [10].

В большинстве исследований для генерации нейтронов использовали ядерные реакторы, однако в настоящее время ведутся активные работы по созданию и введению в эксплуатацию альтернативных источников нейтронов.

Адрес для корреспонденции: byval75vadim@yandex.ru.
Бывальцев В.А.

doi: 10.47056/0365-9615-2021-172-9-356-361

Один из них — ускоритель-тандем с вакуумной изоляцией и литиевой нейтроногенерирующей мишенью (Институт ядерной физики им. Г.И.Будкера СО РАН) [4]. Проведённые *in vitro* эксперименты доказали безопасность пучка нейтронов и его перспективность для дальнейших исследований *in vivo*, в ходе которых была показана эффективность БНЗТ в отношении внутримозговых и подкожных опухолей U87 (глиобластома человека) у иммунодефицитных животных [1,14].

Целью данной работы являлась оценка эффективности БНЗТ, проводимой на источнике эпитепловых нейтронов ускорительного типа в присутствии двух агентов доставки бора: борфенилаланина (BPA) или боркаптатата натрия (BSH), в отношении подкожных ксенографтов аденокарциномы толстой кишки человека SW-620 у мышей линии SCID.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на самцах иммунодефицитных мышей линии SCID (SHO-PrkdcscidHrhr) SPF-статуса ($n=18$) в возрасте 8-10 нед, которые содержались в Центре генетических ресурсов лабораторных животных на базе ЦКП "SPF-виварий" ИЦиГ СО РАН. Все эксперименты проводили с соблюдением принципов гуманного отношения к животным в соответствии с директивой Европейского сообщества (86/609/ЕЕС). В работе использовали культуру опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы человека SW-620, полученную из ЦКП "Центр генетических ресурсов лабораторных животных" ИЦиГ СО РАН. Для получения солидных опухолей мышам в область правого бедра подкожно вводили 100 мкл суспензии, содержащей 10 млн клеток SW-620.

Облучение проводили однократно через 3 нед после имплантации клеток при достижении новообразованиями объёмов 20-100 мкл.

В качестве препаратов бора использовали BPA и BSH, обогащённые изотопом ^{10}B (>99.5%; Katchem Ltd.). Для приготовления раствора BPA добавляли фруктозу (Sigma-Aldrich) в молярном избытке по протоколу [11]. Для получения раствора BSH порошок растворяли в 0.9% NaCl (Renewal). Оба препарата вводили за 2 ч до облучения внутривенно в ретроорбитальный синус: 1-й группе мышей ($n=4$) — BPA в дозе 350 мг/кг, 2-й группе ($n=4$) — BSH в дозе 100 мг/кг.

Концентрацию бора в опухоли, крови, почках, печени и мозге определяли для дальнейшего расчёта "борной дозы" как компонента общей

дозы, полученной животными. Для этого каждый препарат вводили животным с подкожной опухолью SW-620 ($n=3$) внутривенно в ретроорбитальный синус в той же концентрации, что и для проведения БНЗТ. Эвтаназию и забор органов проводили через 2 ч после инъекции. Пробоподготовку проводили по оптимизированным методикам [8], анализ — на спектрометре высокого разрешения iCAP-6500 (Thermo Fisher Scientific). Мышей анестезировали внутрибрюшинным введением домитора 0.1% и золетила 99.9%. На время облучения животных укладывали, как описано ранее [14]. Мышей контрольной группы помещали в аналогичные условия, но не подвергали облучению. Облучение проводили в течение 90 мин; параметры работы ускорителя: энергия протонов — 2,05 МэВ, интеграл тока — 3 мАч.

Для вычисления дозы БНЗТ использовался код NMC для транспорта нейтральных частиц в трёхмерной геометрии методом Монте-Карло [13]. Для вычисления эквивалентной дозы использовали концентрации бора в органах-мишенях животных. Расчётная доза в опухоли для BPA составила 14.70 ± 5.90 Гр-экв, для BSH — 6.63 ± 0.53 Гр-экв. Для расчёта дозы использовали коэффициенты СБЕ (составная биологическая эффективность) и ОБЭ (относительная биологическая эффективность), которые были взяты из работы [7].

В течение периода наблюдения каждые 2-3 сут оценивали общее состояние, двигательную активность и поведение животных, фиксировали изменения кожных покровов как в целом, так и над опухолью. Одновременно с этим измеряли линейные размеры. Объём опухоли рассчитывали по методике [2]: (длина средняя \times ширина средняя²) $\times 0.52$. Показатель торможения роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле [2]: $\text{ТРО} = (\text{средний объём ксенографта в контроле} - \text{средний объём ксенографта в опыте}) / \text{средний объём ксенографта в контроле} \times 100\%$. Для вычисления индекса прироста опухоли (ИПО) использовали формулу [2]: $\text{ИПО} = \text{объём ксенографта в определённый день эксперимента} / \text{объём ксенографта в день начала эксперимента}$.

По этическим соображениям из эксперимента выводили мышей с объёмом опухоли более 4 мл или с потерей массы тела более 20%. Запланированную эвтаназию осуществляли через 60 сут после БНЗТ передозировкой CO_2 , сопровождаемой цервикальной дислокацией.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Microsoft Excel. Вычисляли среднее значение (M) и стандарт-

ное отклонение (SD). Достоверность различий между исследуемыми параметрами определяли с помощью языка программирования Python 3 (библиотеки NumPy, Scipy) с использованием U критерия Манна—Уитни при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Парные сравнения средних объёмов опухолей у животных до облучения не выявили достоверных различий ($p < 0.05$). Анализ размеров опухолей у животных после облучения показал, что быстрее всего прогрессировали опухоли в контрольной группе (рис. 1), где достоверное отличие от исходных значений объёмов наблюдалось уже на 9-е сутки ($p = 0.016$). Достоверное изменение объёмов опухолей в группе БНЗТ+BSH относительно начального размера было отмечено на 11-е сутки ($p = 0.043$). Медленнее всего росли опухоли в группе БНЗТ+ВРА, которые достоверно увеличивались в размерах только через 16 сут после БНЗТ ($p = 0.043$).

Различия в скорости роста опухолей у животных привели к достоверным отличиям в их размерах, которые наблюдались впервые на 9-е сутки между контрольной группой и группой БНЗТ+ВРА ($p = 0.019$). Однако отличия объёмов опухолей в контрольной группе по сравнению с группой БНЗТ+BSH наблюдались только с 28-х суток ($p = 0.033$), но затем сохранялись в течение всего последующего периода наблюдения — до 60-х суток. Различия между контрольной и

облучённой группой были впервые выявлены на 18-е сутки ($p = 0.033$) и имели транзитный характер (рис. 2). Только на 55-е сутки после БНЗТ появились достоверные различия между объёмами опухолей в группе БНЗТ+ВРА и облучения без введения агентов доставки бора ($p = 0.043$), которые сохранялись до 57-х суток ($p = 0.03$) и исчезали на 60-е сутки ($p < 0.05$).

Для оценки межгрупповых различий весь эксперимент разделили на два периода по 30 сут. За первый период наблюдения в группе БНЗТ+ВРА опухоли замедлили рост более чем на 80% (ТРО=80.2%), значение ИПО составило 3.2 ± 2.3 , что значительно отличалось от значений, полученных в контрольной группе — 27.6 ± 18.2 ($p = 0.011$) и в группе облучения — 17.2 ± 7.3 ($p = 0.021$). В группе БНЗТ+BSH ТРО составило 72.4%, ИПО на 30-е сутки от начала эксперимента — 3.4 ± 0.9 и также достоверно отличался от контрольной группы ($p = 0.011$) и группы облучения без введения препаратов бора ($p = 0.021$) (рис. 3).

Однако во втором периоде наблюдения опухоли в группах БНЗТ продолжили рост: ИПО в группе БНЗТ+ВРА составил 21.5 ± 13.9 ($p < 0.05$), в группе БНЗТ+BSH — 19.5 ± 10.0 ($p = 0.03$). ИПО в контрольной группе был максимальным в течение всего периода наблюдения: 80.7 ± 49.6 , несмотря на то что половина особей из этой группы была исключена по этическим соображениям ($n = 3$) через 30 сут после начала эксперимента (рис. 2, 3). ТРО для БНЗТ с ВРА и BSH

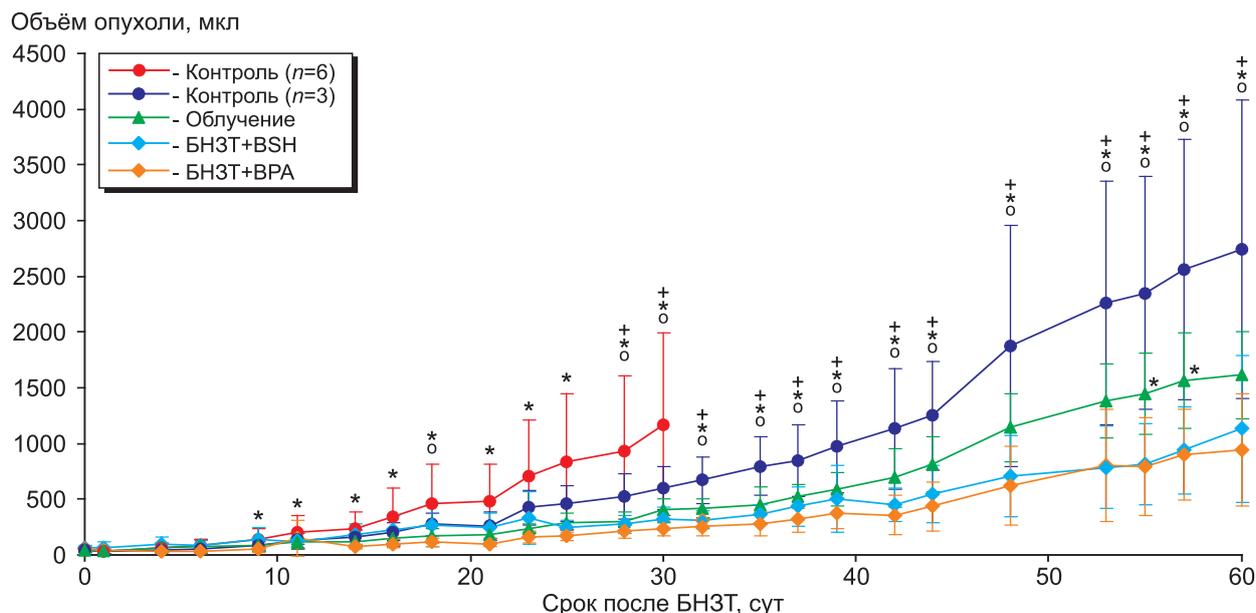


Рис. 1. Динамика средних объёмов подкожных опухолей SW-620 у мышей экспериментальных групп. $p \leq 0.05$ по сравнению * с группой БНЗТ+ВРА, * с группой БНЗТ+BSH, * с группой облучения.

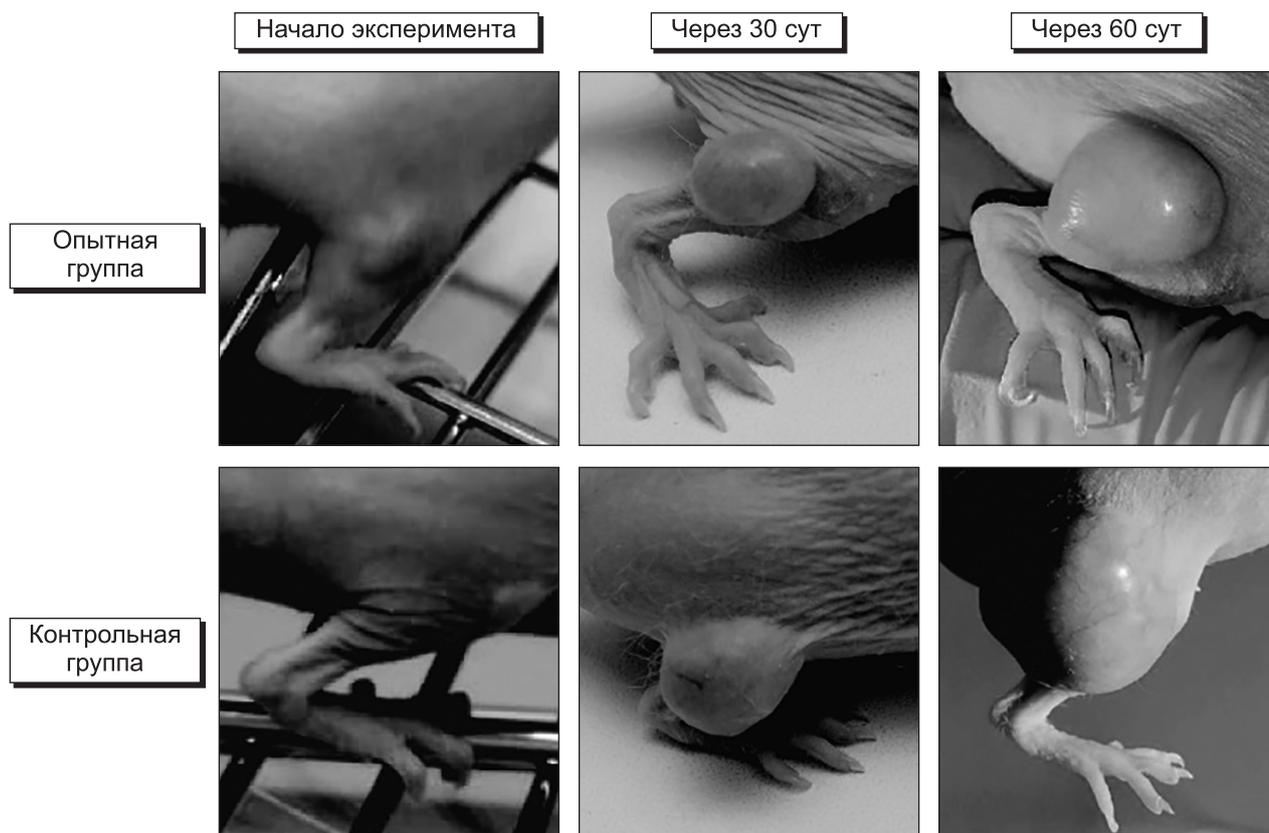


Рис. 2. Фото мышей опытной (БНЗТ+ВРА) и контрольной (без облучения) групп в динамике: в день эксперимента (проведение БНЗТ) и на 30-е и 60-е сутки после БНЗТ.

во втором периоде наблюдения составило 65.6 и 60% соответственно.

Эксперименты с лабораторными животными позволяют в кратчайшие сроки определить эффективность проводимой терапии и повысить её качество. Однако эти исследования имеют ограничения, так как временной отрезок развития опухоли у лабораторных животных значительно короче, чем у человека. Ранее выполненные исследования показали эффективность БНЗТ, проводимой на реакторах, в отношении опухолей различной локализации и гистотипа [3]. В данной работе исследовали возможность применения БНЗТ для лечения колоректального рака при использовании пучка эпитепловых нейтронов, генерируемого на ускорителе в Институт ядерной физики им. Г.И.Будкера СО РАН.

Для группы БНЗТ+ВРА эквивалентная доза, полученная опухолью, была в 2 раза больше, чем в группе БНЗТ+BSH. Это может быть причиной того, что опухоли в группе БНЗТ+ВРА прогрессировали медленнее всего в 1-й месяц наблюдения. Следует отметить, что дозы, полученные другими органами и кровью, варьируют в пределах 1.7-2.1 Гр-экв, что в 5 раз меньше

эквивалентной дозы, полученной опухолью в группе БНЗТ+ВРА, и в 3 раза меньше — в группе БНЗТ+BSH.

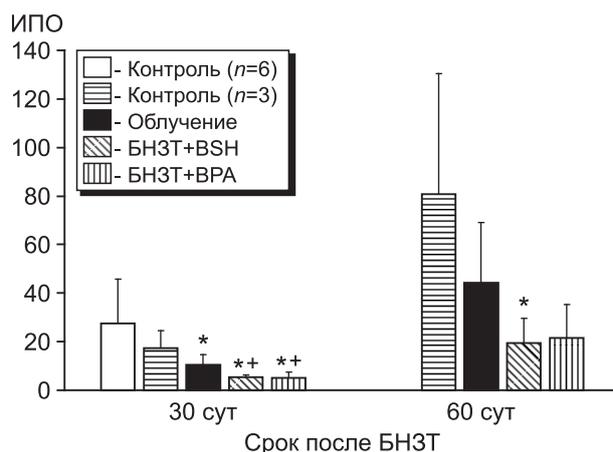


Рис. 3. Индекс прироста объема подкожных опухолей SW-620 в экспериментальных группах мышей. Через 30 сут после начала эксперимента 50% особей контрольной группы были подвергнуты эвтаназии по этическим соображениям. $p \leq 0.05$ по сравнению *с контролем, *с облучением (*U* критерий Манна—Уитни).

Во всех опытных группах опухоли росли значительно медленнее, чем в контрольной, с 28-х суток после облучения. В группе облучения опухоли прогрессировали медленнее, чем в контрольной, но в период 30-60 сут после терапии значимых различий выявлено не было, что говорит об эффективности БНЗТ по сравнению с облучением нейтронами без препаратов бора. Максимальных размеров опухоли достигали в контрольной группе (без облучения) — 3000-4000 мкл. В результате 50% особей этой группы были исключены из эксперимента по этическим причинам через 1 мес после начала эксперимента.

Прирост объёмов опухолей в группе БНЗТ+ВРА достоверно отличался от контрольной группы в течение всего наблюдения. Однако, как отмечалось ранее, замедление роста опухолей было более выражено в 1-й месяц после проведения терапии. Вероятно, доза, полученная опухолью, была мала из-за недостаточного накопления изотопа ^{10}B в опухоли. Одним из путей улучшения данного показателя может быть повышение концентрации вводимых борсодержащих веществ. Другим способом повышения эффективности накопления изотопа может быть наиболее оптимальный путь введения препарата. В исследовании, проведённом на гетеротопических ксенографтах U87, отмечалось увеличение накопления ^{10}B опухолью при внутриопухолевом и внутрибрюшинном введении борфенилаланина по сравнению с внутривенным введением [8].

В традиционной лучевой терапии используется фракционирование дозы облучения для улучшения контроля над опухолью и уменьшения побочных эффектов. При БНЗТ также существует практика деления дозы на 2 [9] или 4 [12] фракции. Применение фракционирования в дальнейших исследованиях может иметь положительный результат.

Таким образом, исследование *in vivo* развития подкожных ксенографтов колоректальной опухоли человека SW-620 у мышей после введения агентов доставки бора ВРА и BSH с последующим облучением потоком эпитепловых нейтронов, полученных на ускорителе в Институт ядерной физики им. Г.И.Будкера СО РАН, показало достоверное замедление роста опухоли (ТРО до 80%), что свидетельствует о перспективности развития данного направления терапии опухолей.

Авторы выражают благодарность А.Н.Макарову, И.М.Шудло, Я.А.Колесникову, Е.О.Сokolовой, А.М.Кошкареву, Т.А.Быкову за обеспе-

чение генерации нейтронов, А.Н.Макарову за предоставленные фотографии, А.А.Касатову и В.Р.Касатовой за помощь в подготовке иллюстративного материала.

Работа проведена при поддержке РФФ (проект № 19-72-30005) с использованием оборудования ЦКП "Центр генетических ресурсов лабораторных животных" ФИЦ ИЦиГ СО РАН и проекта Министерства образования и науки РФ (RFMEFI62117X0015).

ЛИТЕРАТУРА

1. Каныгин В.В., Завьялов Е.Л., Симонович А.Е., Касатова А.И., Кичигин А.И., Разумов И.А., Таскаев С.Ю. Бор-нейтронозахватная терапия глиобластомы человека на моделях опухоли *in vivo* // *Соврем. пробл. науки и образования*. 2019. № 1. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28480> (дата обращения: 03.07.2021).
2. Соловьева О.И., Завьялов Е.Л., Теплякова Т.В., Лебедев Л.Р., Разумов И.А. Эффект экстракта мицелия *duddingtonia flagrans* на подкожные ксенографты клеток с33а карциномы шейки матки человека // *Сиб. онкол. журн.* 2020. Т. 19, № 6. С. 93-98. doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-6-93-98
3. Таскаев С.Ю., Каныгин В.В. Бор-нейтронозахватная терапия. Новосибирск, 2016.
4. Byvaltsev V., Kanygin V., Belykh E., Taskaev S. Prospects in boron neutron capture therapy of brain tumors // *World Neurosurg.* 2012. Vol. 78, N 1-2. P. 8-9. doi: 10.1016/j.wneu.2012.05.026
5. Dagrosa M.A., Crivello M., Perona M., Thorp S., Santa Cruz G.A., Pozzi E., Casal M., Thomasz L., Cabrini R., Kahl S., Juvenal G.J., Pisarev M.A. First evaluation of the biologic effectiveness factors of boron neutron capture therapy (BNCT) in a human colon carcinoma cell line // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2011. Vol. 79, N 1. P. 262-268. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.07.020
6. Dymova M.A., Taskaev S.Y., Richter V.A., Kuligina E.V. Boron neutron capture therapy: current status and future perspectives // *Cancer Commun. (Lond)*. 2020. Vol. 40, N 9. P. 406-421. doi: 10.1002/cac2.12089
7. Hiratsuka J., Fukuda H. Malignant melanoma // *Neutron Capture Therapy. Principles and Applications* / Eds W.Sauerwein, A.Wittig, R.Moss, Y.Nakagawa. Springer-Verlag, 2012. P. 433-448.
8. Kanygin V., Tsygankova A., Kichigin A., Zavjalov E., Razumov I., Guseynikova T., Kasatova A., Sibirtsev R., Mukhamadiyarov R. Effectiveness of different BNCT-drug injection methods // *RAP Conf. Proc.* 2020. Vol. 5. P. 33-37. doi: 10.37392/RapProc.2020.09
9. Koivunoro H., Kankaanranta L., Seppälä T., Haapaniemi A., Mäkitie A., Joensuu H. Boron neutron capture therapy for locally recurrent head and neck squamous

- cell carcinoma: An analysis of dose response and survival // *Radiother. Oncol.* 2019. Vol. 137. P. 153-158. doi: 10.1016/j.radonc.2019.04.033
10. *Maruyama K., Ishida O., Kasaoka S., Takizawa T., Utoguchi N., Shinohara A., Chiba M., Kobayashi H., Eriguchi M., Yanagie H.* Intracellular targeting of sodium mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) to solid tumors by transferrin-PEG liposomes, for boron neutron-capture therapy (BNCT) // *J. Control. Release.* 2004. Vol. 98, N 2. P. 195-207. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.04.018
11. *Rossini A.E., Dagrosa 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
12. *Wittig A., Hideghety K., Paquis P.* Current clinical results of the EORTC-study 11961 // *Research and development in neutron capture therapy / W.Sauerwein, R.Moss, A.Wittig.* Bologna, 2002. P.1117-1122.
13. *Yurov D.V., Anikeev A.V., Bagryansky P.A., Brednikhin S.A., Frolov S.A., Lezhnin S.I., Prikhodko V.V.* Parameters optimization in a hybrid system with a gas dynamic trap based neutron source // *Fusion Eng. Design.* 2012. Vol. 87, N 9. P. 1684-1692. doi: 10.1016/j.fusengdes.2012.07.005
14. *Zavjalov E., Zaboronok A., Kanygin V., Kasatova A., Kichigin A., Mukhamadiyarov R., Razumov I., Sycheva T., Mathis B.J., Maezono S.E.B., Matsumura A., Taskaev S.* Accelerator based boron neutron capture therapy for malignant glioma: a pilot neutron irradiation study using boron phenylalanine, sodium borocaptate and liposomal borocaptate with a heterotopic U87 glioblastoma model in SCID mice // *Int. J. Radiat. Biol.* 2020. Vol. 96, N 7. 868-878. doi: 10.1080/09553002.2020.1761039

Получено 11.06.21

