

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ» (НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ, НГУ)

Факультет **ФИЗИЧЕСКИЙ**

Кафедра **БИОМЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ**

Магистерская программа **ФИЗИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ**

Направление подготовки **03.04.02 ФИЗИКА**

Образовательная программа: **МАГИСТРАТУРА**

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
научно-исследовательский формат

Суродин Дмитрий Сергеевич

(Фамилия, Имя, Отчество автора)

Тема работы: **ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ ЛИТИЙ-
НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ**

«К защите допущен»

Заведующий кафедрой

Научный руководитель

Д.ф-м.н., профессор

К.м.н.

Зав. лабораторией «Цитометрии и
Биокинетики» ИХКГ СО РАН

Н.с. лаб. ультраструктурных исследований
НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН

Мальцев В.П./.....

(фамилия И., О.) / (подпись, МП)

Таскаева Ю.С./.....

(фамилия И., О.) / (подпись, МП)

«.....».....2022г.

«.....».....2022г.

Дата защиты: «.....».....2022г.

Новосибирск, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Меланома кожи	6
1.2 Физические основы бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ)	7
1.3 Использование БНЗТ для терапии меланомы кожи	10
1.4 Основные проблемы БНЗТ и перспективы развития	12
1.5 Литий – как потенциальный агент для НЗТ	15
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	19
2.1 Реагенты	19
2.2 Дизайн исследования	19
2.3 Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой	21
2.4 Оценка фармакокинетики лития	21
2.5 Гистологические исследования и PAS-окрашивание	22
2.6 Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ)	22
2.7 Статистический анализ	23
ГЛАВА III РЕЗУЛЬТАТЫ	24
3.1 Оценка биораспределения лития	24
3.2 Оценка фармакокинетики лития	28
3.3 Оценка веса животных	30
3.4 Гистологическое исследование срезов почки	31
3.5 Ультраструктура фильтрационного барьера почки	33
ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
ВЫВОДЫ	43
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	45

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются одной из ведущих причин смертности в мире и создают все большую угрозу здоровью населения. Одним из перспективных подходов к терапии рака, активно разрабатываемых в настоящее время России, является бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ). Передовые исследования по БНЗТ также проводятся в Японии, Финляндии, Китае и США.

Основной идеей БНЗТ является избирательное уничтожение клеток опухоли в результате реакции бора с тепловыми нейтронами ($^{10}\text{B}(n, \alpha) ^7\text{Li}$) путем накопления в раковых клетках стабильного изотопа бора-10 (^{10}B) и последующего облучения тепловыми нейтронами (^1n). Основными проблемами повсеместного использования БНЗТ являются накопление требуемых концентраций бора в опухоли, а также достижение нужных параметров по току нейтронов. Таким образом, БНЗТ имеет ряд недостатков, которые в настоящее время решаются с различной степенью успеха. Так, например, в институте Ядерной физики имени Г.И. Будкера СО РАН был разработан источник нейтронов [1] с необходимыми физическими показателями для БНЗТ. Продолжаются исследования для синтеза новых и усовершенствования существующих препаратов для адресной доставки бора [2]. В этих условиях, радикальным перспективным нововведением в нейтронозахватной терапии опухолей мог бы стать переход на новую реакцию с атомами лития вместо атомов бора.

Ранее была выдвинута гипотеза, согласно которой для избирательного уничтожения раковых клеток можно использовать реакцию $^6\text{Li}(n, \alpha) ^3\text{H}$, в которой в качестве ядра-мишени выступает изотоп лития (^6Li), а продуктами реакции выступают альфа-частица ($^4\text{He}^{2+}$) и изотоп водорода – тритий (^3H). Перспективность использования ^6Li вместо ^{10}B может быть обусловлена биологическими особенностями проникновения лития в клетку через натрий-

калиевые каналы, в то время как доставка бора внутрь клетки осуществляется только в составе сложных белковых или аминокислотных соединений. Кроме того, энергетический выход (n, α) ядерной реакции для ${}^6\text{Li}$ с тепловыми нейтронами выше, чем для ${}^{10}\text{B}$. Также в ходе данной реакции не происходит испускание гамма-квантов, которые могут негативно влиять на организм. Необходимо отметить, что возможные препараты для терапии рака с использованием ${}^6\text{Li}$ могут быть созданы в России на основе существующих в настоящее время технологий. Одной из основных проблем для возможного применения литий-нейтронной реакции является проблема достижения необходимой концентрации лития в раковых клетках, что является практически неизученной областью в сфере нейтронозахватной терапии. Известно, что терапевтическая концентрация препаратов бора в опухоли для проведения БНЗТ составляет 20 мкг/г, тогда как теоретическая концентрация для успешного применения литий-нейтронозахватной терапии по расчётам, вероятно, составляет 40 мкг/г. Таким образом, учитывая все вышесказанное, представляется актуальным исследование накопления лития в опухоли для проверки гипотезы о возможности реализации Li-НЗТ.

Результаты исследования не имеют аналогов в мировой практике, поскольку впервые будет выполнена оценка накопления лития в опухоли и в органах, удаленных от опухолевого роста с использованием атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой; кроме того, одновременно с этим будет проведена оценка токсического воздействия лития на органы, отдаленные от опухолевого роста. Детальное исследование структуры почек, являющегося основным органом-мишенью для лития, позволит практически оценить возможность однократного введения лития для Li-НЗТ в сверхвысоких дозировках.

Цель исследования:

Определить концентрации лития в опухоли, окружающих тканях и отдаленных от опухолевого роста органов экспериментальных животных с

меланомой В16 и оценить потенциальную токсичность лития в используемых дозировках.

Задачи исследования:

1. Оценить концентрации лития в образцах опухоли, в тканях, окружающих опухоль, крови и органах, удаленных от опухолевого роста с использованием метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой.

2. Определить соотношение концентраций лития опухоль/кожа (нормальная ткань) и опухоль/кровь.

3. Оценить фармакокинетические показатели лития в опухоли, коже, крови, почках и головном мозге.

4. Проанализировать морфологические изменения почек при введении сверхвысоких доз лития в условиях отдаленного опухолевого роста.

Автор благодарен сотрудникам лаборатории ультраструктурных исследований НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН: д.б.н., проф. Бгатовой Н.П., Макаровой В.В., Обаниной Н.А. за помощь в проведении экспериментальных работ; сотрудникам лаборатории 9.0 ИЯФ СО РАН: д.ф.-м. н. Таскаеву С.Ю., Касатовой А.И. за помощь в проведении атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой; Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Меланома кожи

Меланома кожи представляет собой наиболее агрессивный тип рака кожи, возникает из пигмент-продуцирующих клеток кожи – меланоцитов. Большинство меланом (> 95%) являются опухольями кожной локализации, и чаще всего обнаруживаются на участках кожи, подвергающихся воздействию солнца, но не ограничены ими.

Заболеваемость меланомой постоянно растет во всех европейских регионах в течение последних нескольких десятилетий [3, 4]. Наиболее резкое увеличение заболеваемости фиксируется преимущественно в промышленно развитых странах с европеоидным населением: Северная Америка [5], Европа [4], а также Австралия [6] и Новая Зеландия [7]. Воздействие солнца по-прежнему считается основным фактором риска развития меланомы [8].

Тактика лечения меланомы зависит от стадии заболевания, распространенности патологического процесса и наличия регионарных/отдаленных метастазов. На ранних стадиях используется хирургическое удаление опухоли с захватом прилегающих нормальных тканей [9]. Для лечения меланомы на более поздних стадиях используются системная и лучевая терапия. Системная терапия нацелена на уничтожение раковых клеток с помощью лекарственных препаратов и включает в себя химиотерапию, таргетную терапию и иммунотерапию. Химиотерапия на протяжении многих лет считалась стандартом лечения метастатической меланомы [10]. Новые методы лечения, разработанные за последние десять лет, такие как таргетная терапия, и иммунотерапия, позволили значительно улучшить общую выживаемость у пациентов с меланомой [11].

Лучевая терапия меланомы кожи включает в себя множество различных методов воздействия, отличающихся по типу частиц, несущих энергию к

раковой клетке и по особенностям воздействия на клетку, в частности, на механизм ее гибели в результате воздействия [12]. БНЗТ относится к одной из разновидностей лучевой терапии, и на сегодняшний день имеются данные, демонстрирующие явные успехи данного метода в терапии меланомы кожи [13].

Несмотря на перспективные достижения последних лет, касающиеся последних разработок в химиотерапии меланомы, например, использование ингибиторов иммунных чекпоинтов, в настоящее время чрезвычайно актуален поиск новых подходов для терапии меланомы кожи на поздних стадиях, а также метастазирующей меланомы и меланомы внекожной локализации [14].

1.2 Физические основы бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ)

В последние годы существенно растет интерес исследователей к разработке подхода, основанного на избирательном воздействии на опухолевые клетки при минимальной травматизации нормальных тканей. БНЗТ — перспективный метод лечения, направленный на улучшение терапевтического отношения, а именно увеличения отношения поглощённой дозы излучения в опухоли к поглощённой дозе излучения в здоровых тканях.

БНЗТ была впервые предложена Гордоном Лочером в 1936 году [15], который предположил, что если бы ^{10}B можно было сконцентрировать в опухоли, а затем подвергнуть воздействию тепловыми нейтронами (^1_0n), то опухоль избирательно получила бы более высокую дозу по сравнению с нормальными тканями. Физическая основа методики БНЗТ основана на ядерном захвате и делении после облучения нерадиоактивного ^{10}B низкими тепловыми нейтронами ($<0,025$ эВ), что приводит к появлению ядра бора-11 (^{11}B) в возбужденном состоянии, которое практически мгновенно распадается на ядро лития-7 (^7Li) и ядро гелия – альфу-частицу ($^4\text{He}^{2+}$), с выделением 2,38 МэВ [$^{10}\text{B} + ^1_0\text{n} \rightarrow [^{11}\text{B}] \rightarrow ^7\text{Li} + ^4\text{He}(\alpha) + 2,38$ МэВ]. Альфа-частицы

(${}^4\text{He}^{2+}$), представляют собой форму частиц с высокой линейной передачей энергии [16], которые отдают свою энергию на расстоянии <10 мкм, что примерно равно диаметру одной клетки. Таким образом, селективное накопление ${}^{10}\text{B}$ внутри клеток опухоли и последующее облучение тепловыми нейтронами (${}^1\text{n}$), должно приводить к разрушению клеток опухоли с относительно малыми повреждениями окружающих нормальных клеток.

На рис. 1 схематично изображен принцип воздействия БНЗТ на опухолевую клетку.

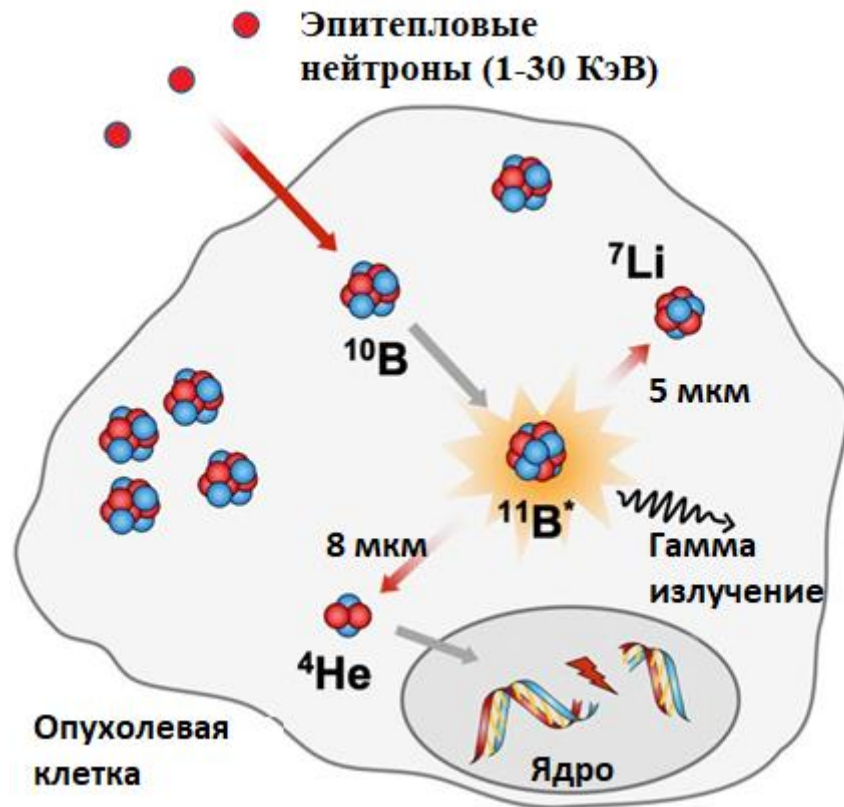


Рис. 1. Схематическое изображение реакции $^{10}\text{B}(n,\alpha)^{7}\text{Li}$. Адаптировано с Norrenz P. et. al. 2020 [17].

1.3 Использование БНЗТ для терапии меланомы кожи

Mishima и соавт. были первыми, кто предложил БНЗТ в 1973 году для лечения меланомы с использованием борфенилаланина (БФА) в качестве агента доставки [18]. В 1987 году, в ходе экспериментальных клинических исследований, Mishima и соавт. успешно провели БНЗТ метастатической меланомы на реакторах технологического института Мусаси (Кавасаки, Япония) [19].

В период с 1987 по 2002 гг. Mishima и его группа пролечили 22 пациента с меланомой, используя БФА в качестве агента доставки бора [20]. Эксперимент проводился на реакторах технологического института Мусаси (Кавасаки, Япония) и Киотского университета (Куматори, Япония). Частота полного ответа составила 73% (16/22), а частота частичного ответа составила 23% (5/22). Сопутствующее лучевое повреждение кожи было приемлемым у 19 пациентов, у остальных трех облученных пациентов развились кожные язвы или некроз. Выживаемость 11 пациентов из 22 после БНЗТ составила от 0,9 до 13 лет. Четыре пациента с метастатической меланомой умерли от системных метастазов в течение трех лет после БНЗТ.

Другая группа исследователей, Hiratsuka и др., выполнили БНЗТ восьми пациентам с меланомой кожи в период с 2003 по 2014 годы [21]. БНЗТ была проведена на исследовательском реакторе Киотского университета. Пациентам вводили фруктозный комплекс борфенилаланина (БФА-фруктоза, БФА-Ф) в качестве агента доставки бора. Шесть пациентов (75%) показали полный ответ, у двух пациентов имелся лишь частичный ответ. Три пациента умерли в сроки от 5,5 до 12,6 лет после БНЗТ. Пять пациентов на момент оценки отдаленных результатов (20 января 2020 г.) были живы без признаков рецидива заболевания [21].

Аргентинской командой исследователей на базе ядерного исследовательского реактора для лечения рака РА-6 (Барилоче, Аргентина)

[22] было выполнено облучение семи пациентов с меланомой с множественными метастазами в конечности в период с 2003 по 2007 год [23]. Поскольку у всех пациентов были множественные метастазы, не ожидалось, что БНЗТ продлит выживаемость. Частота клинического ответа (полный ответ + частичный ответ) составила 69,3%. Выживаемость пациентов колебалась от 4 до 23 месяцев после БНЗТ.

Успешное клиническое испытание источника нейтронов [24] на одном пациенте в Пекине (Китай), показало полный ответ [25]. В качестве средства доставки бора использовали БФА-Ф. Выполненная через 24 месяца после БНЗТ позитронно-эмиссионная томография/компьютерная томография (ПЭТ/КТ) не выявила аномального поглощения фтордезоксиглюкозы, что свидетельствовало об отсутствии опухолевых клеток.

Клинические исследования БНЗТ до сих пор проводились, как правило, на отдельных группах пациентов в различных центрах по всему миру. На странице международного регистра клинических исследований ([https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=melanoma&term=BNCT&cntry=&state=&city=&dist](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=melanoma&term=BNCT&cntry=&state=&city=&dist=) =) можно ознакомиться с записями об уже завершенных и еще рекрутирующих пациентов клинических исследованиях по всему миру. Каждый центр по необходимости разрабатывал свои собственные методы измерения, расчета и назначения поглощенных доз для этих испытаний в рамках собственных программ исследований. По прошествии более 60 лет (начало разработки агентов доставки бора) БНЗТ по-прежнему остается, по большей части, экспериментальным подходом без стандартизированных методов для калибровки используемых смешанных полей излучения и расчета планов лечения. Клинический интерес БНЗТ сосредоточен в первую очередь на лечении глиом высокой степени злокачественности (первичная опухоль головного мозга) и пациентов с опухолями в области головы и шеи, у которых традиционная терапия в абсолютном большинстве случаев оказывается неэффективной [26]. Кроме того, БНЗТ может быть перспективной для

лечения множественной меланомы и меланомы на поздних стадиях [27, 28]. К настоящему моменту уже около 1000 пациентов по всему миру получили БНЗТ [26].

1.4 Основные проблемы БНЗТ и перспективы развития

Развитие БНЗТ сталкивалось с множеством проблем, вплоть до полной остановки исследований. Впервые программа БНЗТ была приостановлена в США в 1961 году из-за неудовлетворительных результатов испытаний, которые имели мощные побочные эффекты [29, 30]. Далее, в ряде стран (Австрия, Бельгия, Германия, Италия, Филиппины, Южная Корея, Швеция, Швейцария) происходит поэтапный отказ от ядерной энергии, в то время как в Японии и США ведутся дебаты по поводу использования мирного атома. Длительное время основным источником нейтронов для БНЗТ являлись ядерные реакторы и отказ от эксплуатации ядерной энергии привёл к закрытию большинства программ БНЗТ. Однако после публикации впечатляющих результатов первого клинического применения БФА Mishima и соавт. [31], в 1989 году начались более активные исследования БНЗТ.

Традиционным источником нейтронов являются ядерные реакторы, в которых осуществляется управляемая самоподдерживающаяся цепная реакция деления ядер. Данные реакторы способны производить тепловые нейтроны с низкой энергией (0,025 эВ). Однако, для эффективной терапии глубоко расположенных новообразований требуются пучки нейтронов с большей энергией (так называемые эпитепловые нейтроны, от 1 до 30 КэВ), что позволило бы достичь увеличения количества нейтронов на большей глубине проникновения пучка (8 см) [32]. С этой целью начались разработки новых источников нейтронов и модернизация традиционных ядерных реакторов, отвечающих этим требованиям.

В настоящее время одной из основных проблем успешного проведения БНЗТ является достижение необходимых показателей концентрации атомов бора в крови и клетках опухоли в определенный период времени. На данный момент существует три поколения соединений бора, и в каждом поколении эти агенты доставки бора постоянно совершенствуются.

Агенты доставки первого поколения представляли собой борную кислоту и низкомолекулярные соединения бора [2]. Эти химические соединения неизбирательно захватывались опухолевыми клетками и имели низкое соотношение концентраций опухоль/мозг. В качестве средств доставки они применялись в клинических испытаниях в 1950-х и начале 1960-х годов [29, 30].

Агенты доставки второго поколения – это БФА и боркапнат натрия (БКН) [2]. Они обладали значительно меньшей токсичностью, дольше сохранялись в опухолях животных по сравнению с родственными молекулами, а соотношения опухоль/мозг и опухоль/кровь по концентрации бора составляло >1 . Эти соединения в настоящее время используются во многих доклинических и клинических исследованиях.

Агенты доставки третьего поколения представляют собой стабильную группу или кластер бора, соединенные гидролитически стабильной связью с компонентом или фрагментом, нацеленным на опухоль (носители бора). Биомолекулы с низкой и высокой молекулярной массой, такие как сахара (БФА-Ф), порфирины, липосомы и моноклональные антитела, изучались в качестве группировки, нацеленной на опухоль. Эти соединения бора, как правило, работают более селективно в отношении опухолевой клетки-мишени, но большинство из них все еще находятся в стадии разработки [16, 17]. Наиболее изученный комплекс БФА-Ф был впервые использован для лечения пациентов с БНЗТ в 1994 году для лечения глиобластомы [33], и в настоящее время является агентом доставки третьего поколения,

использующимся в клинических исследованиях БНЗТ по всему миру [25, 34, 35].

К агентам доставки бора были разработаны требования, соблюдение которых может обеспечить успешность БНЗТ:

- (1) низкая внутренняя токсичность;
- (2) высокое поглощение бора опухолью и низкое – нормальной тканью, в идеале с соотношением концентраций бора опухоль/нормальная ткань и опухоль/кровь $> 3:1$;
- (3) относительно быстрое выведение из крови и нормальных тканей и сохранение в опухоли в течение по крайней мере нескольких часов при нейтронном облучении [16].

Следует отметить, что в настоящее время ни один из существующих агентов доставки, использующихся в клинических испытаниях БНЗТ, в полной мере не соответствует этим требованиям [26].

В настоящее время в клинических исследованиях используются только два агента доставки бора – БКН и БФА, основным недостатком их использования является значительная вариабельность поглощения клетками опухоли, особенно клетками опухолей головного мозга. Это было ясно продемонстрировано Goodman и др. [36]. в исследовании биораспределения и фармакокинетики препаратов бора с участием 20 пациентов с глиомами высокой степени злокачественности. Концентрация бора в опухоли варьировала как в пределах разных участков опухоли, так и среди пациентов, получавших одинаковую дозу БКН. Об аналогичной изменчивости в глиомах сообщили Koivunogo и др. [37]. Кроме того, гетерогенность накопления бора была показана в клетках меланомы кожи [13].

Таким образом, несмотря на развитие метода и обнадеживающие результаты клинических испытаний, технология БНЗТ все ещё далека от внедрения в клиническую практику. Однако уже в настоящее время БНЗТ может существенно улучшить выживаемость и повысить качество жизни

пациентов, имеющих злокачественные новообразования определенного типа/локализации или стадии, для которых любая другая терапия будет иметь минимальную эффективность.

1.5 Литий – как потенциальный агент для НЗТ

Учитывая обозначенные выше проблемы с селективной доставкой бора в опухолевые клетки, радикально иным подходом к проведению нейтронозахватной терапии (НЗТ) может стать переход на новую реакцию с использованием атомов других элементов вместо бора.

Для успешного проведения НЗТ ядра-мишени в выбранной реакции должны обладать большим сечением поглощения тепловых нейтронов. Реакции, которые гипотетически способны заменить реакцию с бором должны иметь высокое значение сечения поглощения нейтронов – более 500 барн [32]. В табл. 1 приведены реакции, которые рассматривались в качестве альтернативы реакции с бором.

Однако поглощение нейтронов большей частью из них – ^{113}Cd , ^{135}Xe , ^{149}Sm , ^{151}Eu , ^{155}Gd , ^{157}Gd , ^{174}Hf , ^{199}Hg – ведет к (n, γ) -реакции, где γ является гамма квантом. Реакции, в которых происходит выделение гамма – кванта не обеспечивают локальности выделения энергии из-за низкого ослабления γ -квантов, которые имеют средний свободный пробег в тканях порядка 40 см.

Изотоп	Вид реакции	Сечение, барн
^3He	(n,p)	5333
^6Li	(n, α)	940
^{10}B	(n, α)	3835
^{113}Cd	(n, γ)	20600
^{135}Xe	(n, γ)	2720000
^{149}Sm	(n, γ)	42080
^{151}Eu	(n, γ)	9200
^{155}Gd	(n, γ)	61100
^{157}Gd	(n, γ)	259000
^{174}Hf	(n, γ)	561
^{199}Hg	(n, γ)	2150
^{235}U	(n,f)	681
^{241}Pu	(n,f)	1380
^{242}Am	(n,f)	8000

Таблица 1. Нуклиды с сечением поглощения тепловых нейтронов более 500 барн Адаптировано с С.Ю. Таскаев. 2019 [32].

Локальность могут обеспечить несколько (n, α)- и (n,f)-реакции вследствие быстрого торможения образующихся α -частиц или продуктов деления ядер. Но применение этих реакций практически не изучалось в силу предполагаемой высокой токсичности лития или радиоактивности урана, плутония и америция, именно поэтому исторически основные экспериментальные работы и клинические испытания нейтронозахватной терапии базируются на использовании бора [32].

Впервые соли лития были использованы в медицинской практике в 1859 году для лечения подагры [38]. Литий активно применяется для лечения психических заболеваний на протяжении уже более 60 лет, и по-прежнему считается средством первой линии для лечения и профилактики биполярного расстройства.

В клинической практике наиболее распространено применение солей лития перорально: карбоната лития или цитрата лития. Обе эти композиции диссоциируют в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, высвобождая ион лития, который быстро и полностью всасывается в основном за счет пассивной диффузии [39]. Будучи водорастворимым одновалентным катионом, литий не связывается с белками плазмы и широко распределяется по всему организму после перорального применения. Натриевые каналы являются одним из важнейших Li^+ -транспортирующих белков через клеточную мембрану. Отток лития из клетки во внеклеточное пространство происходит в основном за счет электрически нейтрального $Na^+ - Li^+$ насоса [40].

Перспективность применения лития в НЗТ может быть обусловлена физиологическими особенностями проникновения ионов лития в клетку. Проницаемость потенциал-зависимых натриевых каналов, которые являются основными источниками входа ионов лития в клетку, одинакова для ионов Na^+ и Li^+ , что даёт низкомолекулярным соединениям практически беспрепятственно проникать в клетки.

После 30 лет исследований и сбора экспериментальных данных у групп пациентов с биполярным расстройством, были сформулирована гипотеза, согласно которой литий замещает натрий и изменяет концентрацию внутриклеточного кальция [40], что даёт предпосылки к тому, что литий будет задерживаться в клетках.

Для успешной реализации БНЗТ считается, что необходимо достичь показателей концентрации бора в опухоли порядка 20 мкг/г [16]. Учитывая, что сечение реакции ${}^6\text{Li}(n,\alpha){}^3\text{H}$ в 4 раза меньше, чем сечение реакции ${}^{10}\text{B}(n,\alpha){}^7\text{Li}$, а высвобождаемая энергия в пределах клетки в 2 раза больше, то вероятно, что минимальная концентрация изотопов лития в опухоли, необходимая для успешного проведения литий-нейтронозахватной терапии (Li-НЗТ) злокачественных новообразований по теоретическим расчетам составляет около 40 мкг/г. Отличительной чертой Li-НЗТ является то, что при реакции ${}^6\text{Li}(n,\alpha){}^3\text{H}$ не происходит испускание гамма-квантов, в отличие от реакции ${}^{10}\text{B}(n,\alpha){}^7\text{Li}$, где гамма-кванты хоть и уносят с собой 16% энергии, но всё же присутствуют в продуктах реакции.

Учитывая все вышесказанное, использование лития, как аналога бора для проведения НЗТ может представлять собой перспективный вектор для проведения дальнейших исследований НЗТ злокачественных новообразований.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реагенты

Параформальдегид (Sigma-Aldrich, США); раствор Хенкса (Биолот, Россия); осмий тетроксид (OsO_4) (Sigma-Aldrich, США); эпон (Serva, Германия); толуидиновый синий (Fluka, США); цитрат свинца (Fluka, США); PBS (фосфатный солевой буфер в таблетках) (Росмедбио, Россия), карбонат лития, Li_2CO_3 (Новосибирский завод редких металлов).

2.2 Дизайн исследования

Работа выполнена на мышах-самцах линии C57BL/6 массой 20-22 г в возрасте 3 мес. Животных содержали на стандартной диете со свободным доступом к воде и пище. Для моделирования опухолевого процесса использовали клеточную линию меланомы кожи мыши B16, любезно подготовленную для имплантации сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН. Для индукции роста опухоли вводили $1 \cdot 10^6$ клеток B16 в 100 мкл 0,9% физиологического раствора хлорида натрия подкожно в правую паховую область. В эксперименте использовали 11 групп животных (по 5 мышей в каждой): мыши с интактной опухолью (группа контроля); мыши, получавшие однократно карбонат лития в дозе 300 мг/кг и мыши, получавшие однократно карбонат лития в дозе 400 мг/кг (рис. 2). Материал для исследований (опухоль, почки, головной мозг, кожа и кровь) брали через 15 мин, 30 мин, 90 мин, 180 мин и 7 дней после введения карбоната лития, в утренние часы. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом методом краниоцервикальной дислокации.

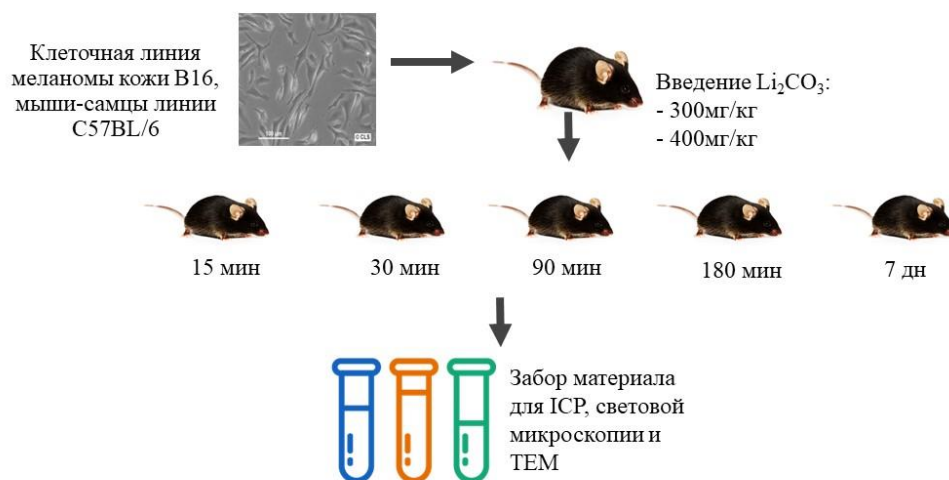


Рис. 2. Дизайн эксперимента для анализа биораспределения лития в опухоли, коже, головном мозге, почках и крови методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой и для оценки острого повреждения почек методами световой и электронной микроскопии у мышей линии C57BL/6 с имплантированной подкожно клеточной линией меланомы кожи B16 после однократного введения карбоната лития в дозе 300 мг/кг и 400 мг/кг *per os*.

2.3 Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой

Для подготовки проб (опухоль, кожа, кровь, почки и мозг) использовали смесь азотной кислоты HNO_3 («ос.ч.» 69%) и перекиси водорода H_2O_2 (30%). Разложение проводили в фальконах объемом 15 мл, которые нагревали до температуры $90\text{ }^\circ\text{C}$ в системе Dry Block Heater 2 (ИКА, Германия), пока раствор не становился прозрачным. Объем пробы доводили деионизованной водой (Milli Q) до 8 мл. Содержание лития определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопией с индуктивно-связанной плазмой (АЭС ИСП) на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно связанной плазмой ICPE-9820 (Shimadzu, Япония), который был откалиброван с использованием стандарта иона лития (Эко-аналитика, Россия) в диапазоне 0,01 – 10 мг/л. Пробы вводили при помощи перистальтического насоса. Регистрацию аналитического сигнала проводили при аксиальном обзоре плазмы для трех аналитических линий — Li 323.261 нм, Li 610.364 нм и Li 670.784 нм.

Итоговое содержание лития в опухоли, крови и органах рассчитывали, используя формулу:

$$\frac{\text{измеренная концентрация} \times \text{объем пробы}}{\text{вес органа}}$$

2.4 Оценка фармакокинетики лития

Фармакокинетические параметры лития в крови, опухоли, почках и в мозге рассчитывали для каждого набора выборочных данных с использованием некомпартментных методов в программе PKSolver версии 2.0. (Pharsight, Mountain View, CA, USA). Площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC_{0-t}) и площадь под кривой первого момента (AUMC_{0-t}) рассчитывали с использованием трапециевидных методов. Максимальная наблюдаемая концентрация (C_{max}) и значения времени до

достижения максимальной концентрации (T_{\max}) были получены непосредственно из профилей зависимости концентрации от времени.

2.5 Гистологические исследования и PAS-окрашивание

Для исследования методом световой микроскопии кусочки головного мозга, почек и кожи фиксировали в 4% растворе параформальдегида, обезвоживали в серии спиртов восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин по общепринятой гистологической методике [41]. Далее, срезы почки были окрашены с использованием периодической кислоты Шиффа (PAS-реакция). Морфология почки оценивалась путем анализа специфического окрашивания гликогена с помощью компьютерной программы ImageJ (Wayne Rasband, США).

Для морфометрии 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.

2.6 Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ)

Для исследования в электронном микроскопе фрагменты почки размером до 1 мм^3 фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 часа в 1% растворе OsO_4 на фосфатном буфере ($\text{pH}=7,4$), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон (Serva, Германия). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм на ультратоме Leica UC7/FC7 (Германия/Швейцария), окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом LEICA DME и

выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 70-100 нм, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (Япония) в Центре коллективного пользования ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы ImageJ (Wayne Rasband, США). Клетки морфометрировали при увеличении в 30000 раз. Определяли количество ножек подоцитов, толщину ножек подоцитов, размер щелевой диафрагмы и число фенестр в эндотелии гломерулярных капилляров в пределах 2 микрометров тестовой линии. С помощью масштабной линейки измеряли толщину гломерулярной мембраны и базальной мембраны эпителиоцитов проксимальных канальцев.

2.7 Статистический анализ

Среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (SD) вычисляли с помощью программного обеспечения Microsoft Excel (Microsoft, США). Достоверность различий между исследуемыми параметрами определяли с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, США) с использованием U-критерия Манна-Уитни при уровне достоверности 95 % ($P < 0,05$).

ГЛАВА III РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Оценка биораспределения лития

Кривые зависимости концентрации лития от времени в крови, опухоли, почках и в мозге после введения карбоната лития Li_2CO_3 в разных дозировках (300 мг/кг и 400 мг/кг) представлены на рис. 3. Кроме того, были получены данные по соотношениям опухоль/кожа (Оп/Ко) и опухоль/кровь (Оп/Кр) на различных временных точках, данные представлены на рис. 4.

Концентрацию Li в опухоли, коже, головном мозге, почках и крови определяли методом АЭС ИСП для каждой временной точки после введения карбоната лития. Отношения концентраций лития Оп/Ко и Оп/Кр рассчитывали для каждой временной точки и для обеих доз лекарственного средства. Максимальная концентрация лития в опухоли была наибольшей на 30 минутной временной точке при дозе 400 мг/кг ($22,41 \pm 4,86$ мкг/г) и на 90 минутной временной точке при дозе 300 мг/кг ($20,02 \pm 7,24$ мкг/г). Время накопления лития в коже для обеих групп было максимальным на 90 минутной временной точке и составило для группы Li-300 $17,45 \pm 6,76$ мкг/г, для группы Li-400 – $20,34 \pm 5,1$ мкг/г. На этой же временной точке была зафиксирована максимальная концентрация лития в крови для обеих групп и составляла для группы Li-300 – $14,11 \pm 3,15$ мкг/г) и для группы Li-400 – $15,12 \pm 4,63$ мкг/г. Максимальное накопление лития в мозге фиксировалось на 180 минутной точке для группы Li-300 ($4,12 \pm 0,92$ мкг/г), а для группы Li-400 максимальная концентрация была отмечена на 90 минутной точке ($3,1 \pm 1,33$ мкг/г). Абсолютная максимальная концентрация лития среди всех исследуемых органов наблюдалась в почках: $36,18 \pm 11,02$ мкг/г для группы Li-300 через 90 мин после введения карбоната лития, и $43,04 \pm 18,69$ мкг/г для группы Li-400 через 30 мин после введения карбоната лития. Также были получены значения концентраций лития для двух доз через 7 дней после введения препарата,

значения во всех исследуемых органах не отличались от фоновых в контрольной группе, что свидетельствует о полном выведении лития (данные не представлены).

Соотношение концентраций лития опухоль/кожа было максимальным на временной точке 180 мин для группы, получавшей карбонат лития в дозе 300 мг/кг и составило 2,34. Для группы Li-400 этот показатель достигал максимума на 30 минутной временной точке и составил 1,47. Соотношение концентраций лития опухоль/кровь было максимальным на временной точке 30 минут для обеих групп и составило 1,86 для группы Li-300 и 2,01 для группы Li-400.

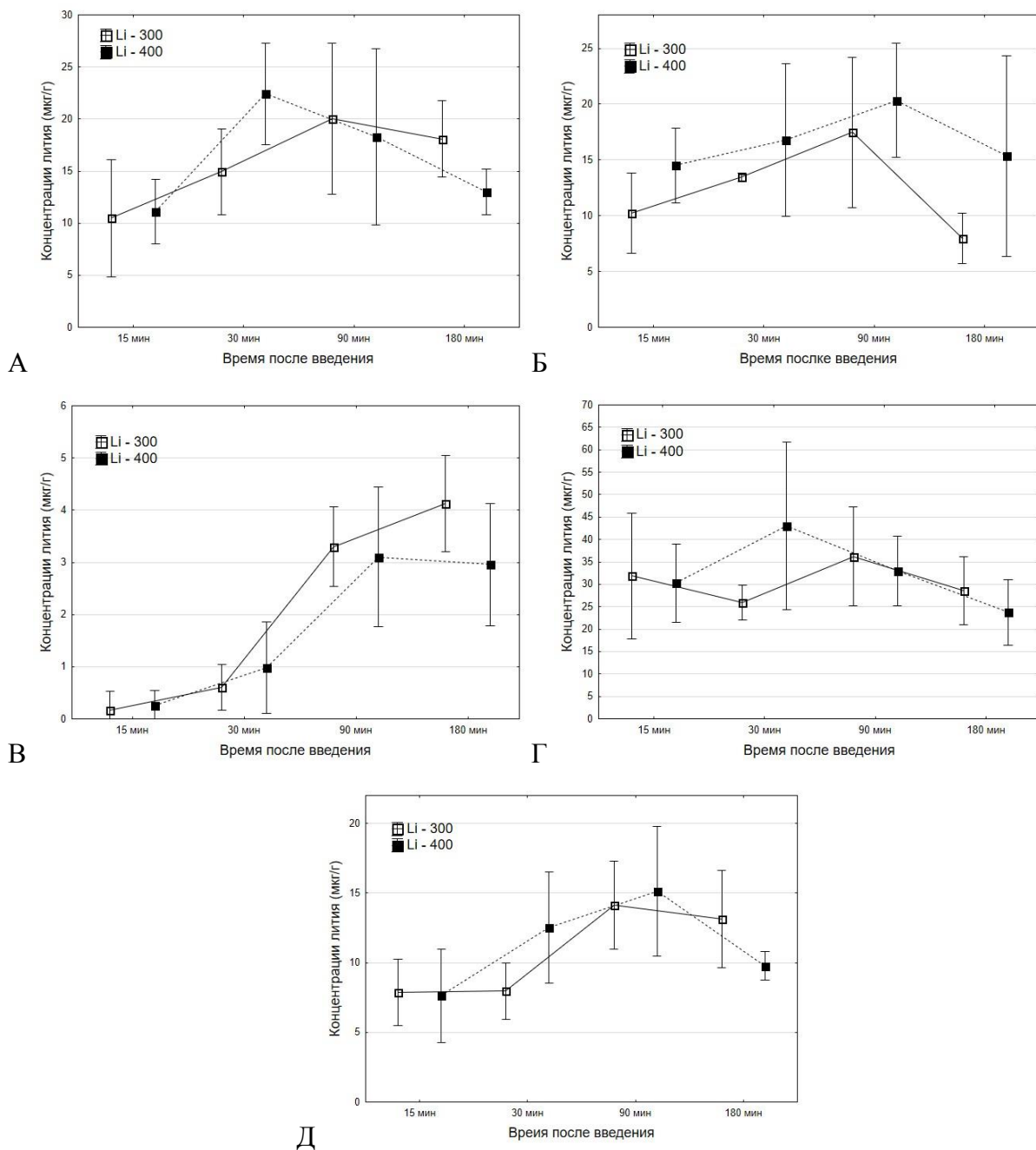


Рис. 3. Оценка накопления лития в опухоли (А), коже (Б), головном мозге (В), почках (Г) и крови (Д) через 15 мин, 30 мин, 90 мин и 180 мин после однократного введения карбоната лития *per os* в дозе 300 и 400 мг/кг. Данные представлены как $M \pm SD$.

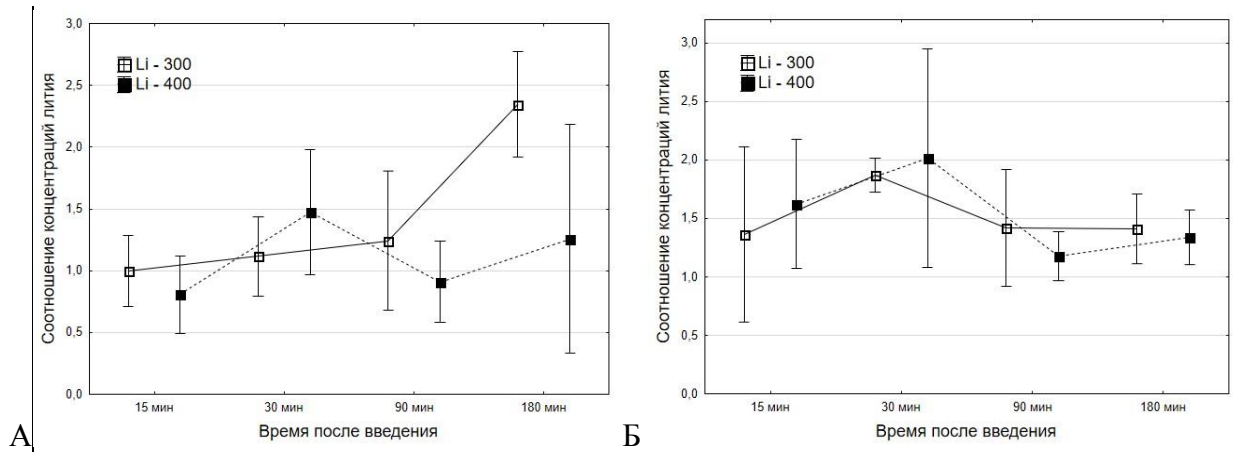


Рис. 4. Оценка соотношения концентраций лития опухоль/кожа (А) и опухоль/кровь (Б) через 15 мин, 30 мин, 90 мин и 180 мин после однократного введения карбоната лития *per os* в дозе 300 и 400 мг/кг. Данные представлены как $M \pm SD$.

3.2 Оценка фармакокинетики лития

Фармакокинетические параметры C_{\max} (максимальная концентрация), T_{\max} (время достижения максимальной концентрации), AUC (Area under the curve, площадь под кривой) и AUMC (Area under the moment curve, площадь под кривой первого момента) были получены при анализе кривых зависимости концентрации лития от времени и представлены в таблице 2. Известно, что показатель C_{\max} отражает пиковую концентрацию препарата в плазме крови после приема, а показатель T_{\max} – демонстрирует время достижения C_{\max} . AUC является одним из основных фармакокинетических параметров, использующихся для оценки биодоступности и характеризующий суммарную концентрацию лекарственного препарата в плазме крови в течение всего времени наблюдения. Показатель AUMC представляет собой общую площадь под кривой первого момента, при котором параметры концентрация \times время отображаются в зависимости от времени.

Время максимальной концентрации (T_{\max}) в опухоли и почках после введения карбоната лития в дозе 300 мг/кг в 3 раза превышало аналогичный показатель после введения карбоната лития в дозе 400 мг/кг, а в головном мозге – в 2 раза. При этом, изменений T_{\max} в коже и крови при введении разных концентраций карбоната лития не наблюдалось. Достоверных различий между фармакокинетическими параметрами AUC и AUMC в группе животных, получавших литий в дозе 300 мг/кг и у животных, получавших литий в дозе 400 мг/кг выявлено не было.

Группа/ Параметры	T _{max} (мин)	C _{max} (мкг/мл или /г)	AUC ₀₋₁₈₀ (мин*мкг/мл или /г)	AUMC ₀₋₁₈₀ (мин*мкг/мл или /г ²)
Карбонат лития, 300 мг/кг				
Опухоль	90	20,02±7,24	3033,37±946,46	300882,07±84457,77
Кожа	90	17,46±6,76	2326,01±675,46	199903,52±64963,1
Почка	90	36,18±11,02	5448,69±1520,44	511801,2±142845,8
Головной мозг	180	4,12±0,92	458,13±120,88	56393,04±13198,91
Кровь	90	14,12±3,15	2067,3±504,18	212511,15±52240,97
Карбонат лития, 400 мг/кг				
Опухоль	30	22,41±4,86	2964,30±961,36	256485,72±81014,87
Кожа	90	20,34±5,1	3063,18±1096,22	283785,63±115900,11
Почка	30	43,04±18,69	5611,01±1741,98	470407,68±134435,73
Головной мозг	90	3,1±1,33	406,74±190,18	46096,83±19559,7
Кровь	90	15,12±4,63	2157,99±593,07	197089,64±44734,13

Таблица 2. Фармакокинетические параметры лития в опухоли, коже, почках, головном мозге и крови после введения Li₂CO₃ *per os*. Забор биологического материала для исследования проводился через 15 мин, 30 мин, 90 мин и 180 мин после введения препарата. Данные представлены как M±SD.

3.3 Оценка веса животных

Для анализа токсического воздействия на мышей, получавших карбонат лития сравнивались средние значения веса экспериментальных животных (табл. 3). Достоверных различий между группами животных, получавших литий в разных дозировках (300 мг/кг и 400 мг/кг) и контрольной группой выявлено не было.

Группа/Параметр	Вес животных, г
Контроль	25,78±1,06
Li-300, 15 мин	22,09±1,9
Li-300, 30 мин	22,58±2,4
Li-300, 90 мин	22,08±2,01
Li-300, 180 мин	22,7±1,68
Li-300, 7 д	23,48±1,47
Li-400, 15 мин	22,9±1,82
Li-400, 30 мин	23,06±1,75
Li-400, 90 мин	23,2±2,73
Li-400, 180 мин	22,34±0,99
Li-400, 7 д	23,76±1,14

Таблица 3. Вес животных после введения Li_2CO_3 *per os*. Забор биологического материала для исследования проводился через 15 мин, 30 мин, 90 мин, 180 мин и 7 дней после введения препарата. Данные представлены как $M \pm SD$.

3.4 Гистологическое исследование срезов почки

Для анализа острого повреждения почек была выполнена количественная оценка окрашивания щеточной каймы почечных канальцев периодической кислотой Шиффа (PAS-реакция) (рис. 5). Однократные введения карбоната лития в дозах 300 и 400 мг/кг не приводили к значительному изменению структуры почечных канальцев. Более того, площадь окрашивания в экспериментальных группах через 7 дней соответствовала значениям в контрольной группе, что свидетельствует об отсутствии острого повреждения почек после введения лития. Достоверных различий в площади окрашивания щеточной каймы почечных канальцев периодической кислотой Шиффа между группами животных, получавших литий в дозе 300 и 400 мг/кг и контрольной группой выявлено не было.

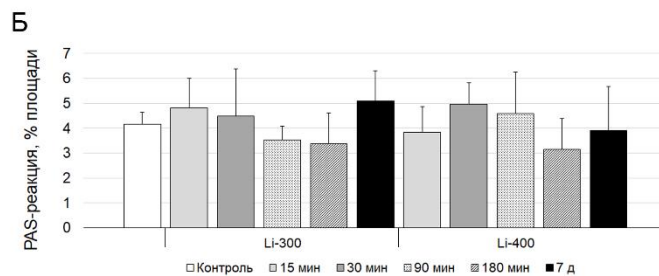
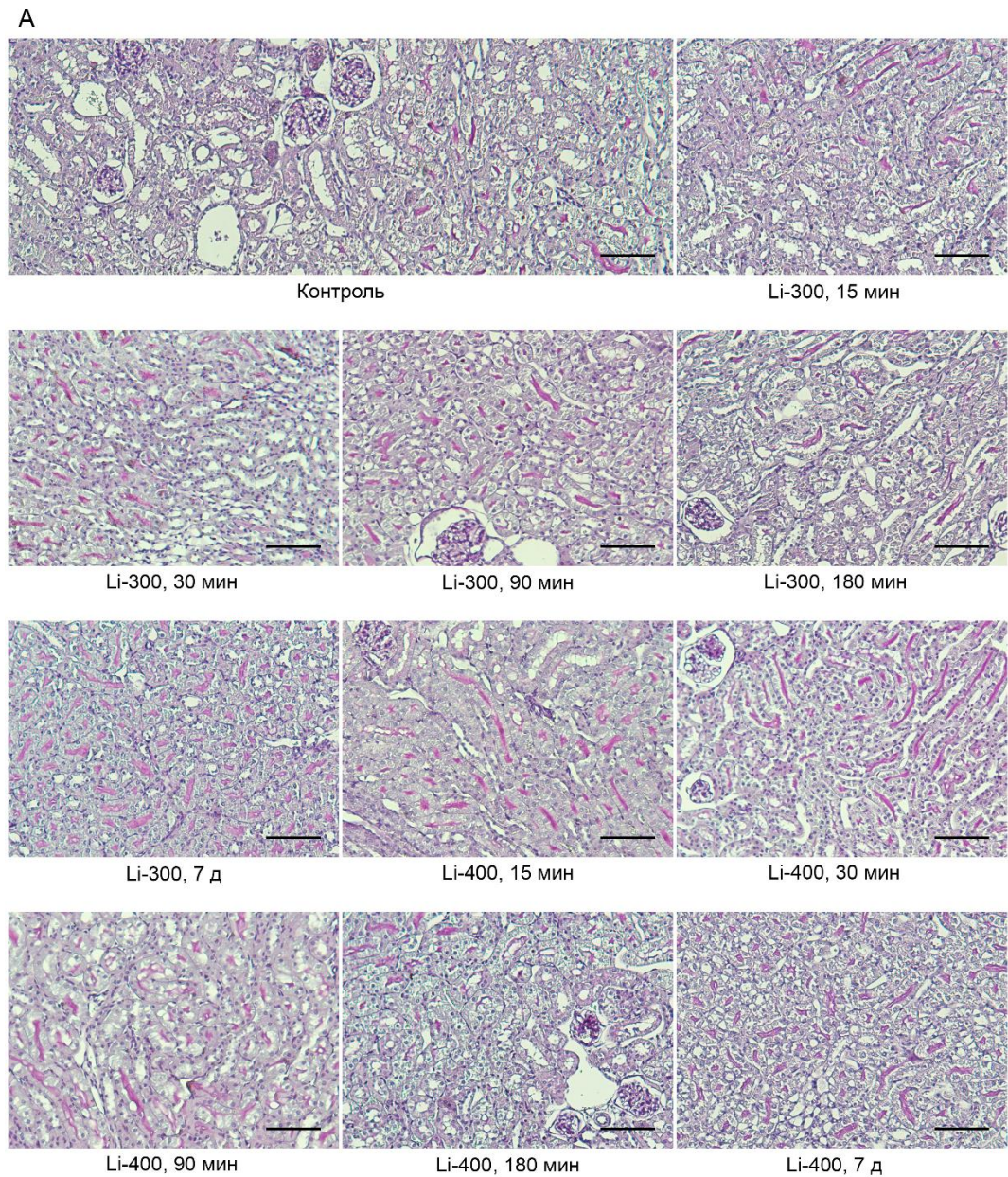


Рис 5. Окрашивание срезов почки периодической кислотой Шиффа (PAS-реакция) через 15 мин, 30 мин, 90 мин, 180 мин и 7 дней после однократного введения карбоната лития в дозе 300 мг/кг (Li-300) и 400 мг/кг (Li-400) *per os* (А). Длина масштабного отрезка 100 мкм. Количественная оценка площади

окрашивания (%) щеточной каймы почечных канальцев периодической кислотой Шиффа (PAS-реакция) (Б). Данные представлены как $M \pm SD$.

3.5 Ультраструктура фильтрационного барьера почки

Все компоненты фильтрационного барьера почки мышей контрольной группы имели типичную ультраструктурную организацию. Фенестры эндотелиоцитов клубочковых капилляров были хорошо выражены. Отмечали гетерогенность ультраструктурной организации подоцитов. Ножки подоцитов часто различались по толщине. Гломерулярная мембрана и базальная мембрана эпителиоцитов проксимальных канальцев имели однородную плотность и толщину (рис. 6).

Однократные введения карбоната лития в дозах 300 и 400 мг/кг не приводили к значительному изменению структуры почечного фильтра (рис. 7 и 8, табл. 4). Достоверных различий среди исследуемых параметров между группами животных, получавших литий в дозе 300 и 400 мг/кг и контрольной группой выявлено не было.

Группа/ Параметры	ГМ, толщина, мкм	НП, ширина, мкм	НП, количество, N	БМ, ширина, мкм	Фенестры, N	ЩД, ширина, мкм
Контроль	57,1±6,9	142,1±101,7	6±2	67,9±14,0	3,6±1,7	15,6±4,4
Li-300, 15 мин	53,2±3,5	135,1±63,4	5,0±1,6	62,8±9,1	3,8±0,8	15,7±3,1
Li-300, 30 мин	59,0±4,4	151,0±75,0	5,8±1,1	62,6±4,0	4,4±1,5	14,0±3,4
Li-300, 90 мин	71,8±11,5	152,3±125,7	5,6±2,7	65,6±12,7	4,2±1,7	15,5±5,2
Li-300, 180 мин	60,9±10,4	153,5±115,8	5,4±0,8	65,7±11,1	3,2±1,3	14,6±3,9
Li-300, 7 д	56,1±5,7	122,8±62,6	6,6±2,0	60,3±8,8	4,8±1,3	16,0±3,2
Li-400, 15 мин	61,2±3,0	121,5±67,5	7,0±0,8	62,1±4,0	3,8±1,1	12,2±2,6
Li-400, 30 мин	55,6±7,9	112,0±55,2	6,5±1,3	59,0±6,0	4,3±0,5	14,0±5,1
Li-400, 90 мин	62,4 ±12,2	134,6±110,7	6,4±1,94	66,8±8,1	3,4±1,6	14±3,4
Li-400, 180 мин	63,6±8,3	189,6±213,5	5,4±2,1	60,3±10,4	3,4±1,5	13,1±3,1
Li-400, 7 д	62,7±7,8	106,0±43,2	7±1,5	65,6±5,9	5±1	16,1±4,4

Таблица 4. Результаты морфометрии почки при однократном введении карбоната лития *per os* в дозе 300 и 400 мг/кг через 15 мин, 30 мин, 90 мин, 180 мин и 7 дней после введения. Достоверных различий при сравнении параметров в группе мышей, получавших литий, и контрольной группе выявлено не было. Данные представлены как $M \pm SD$. ГМ – гломерулярная базальная мембрана; НП – ножки подоцитов; БМ – базальная мембрана эпителиоцитов проксимальных канальцев; фенестры – фенестры эндотелиоцитов гломерулярных капилляров; ЩД – щелевая диафрагма.

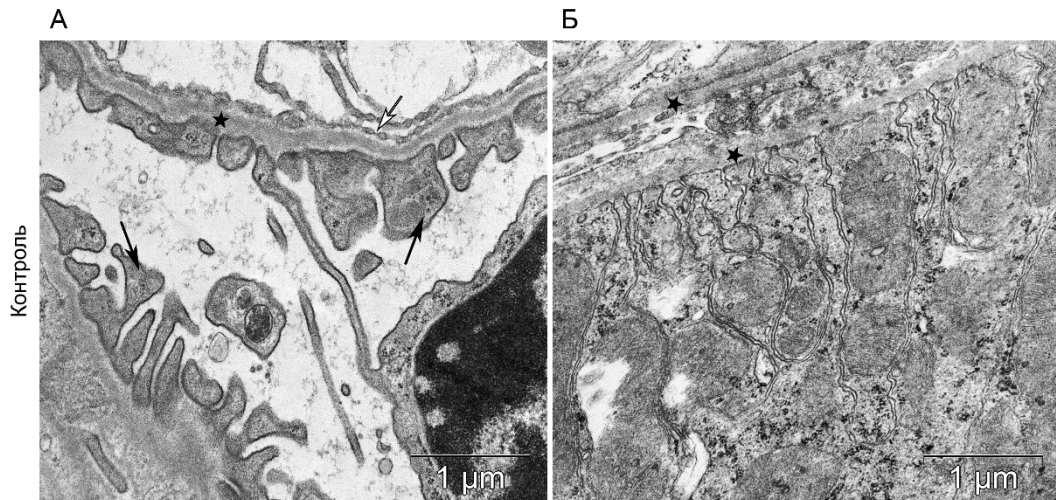


Рис. 6. Структура почки в условиях отдаленного опухолевого роста. Ультраструктура почечного фильтра (А). Гломерулярная базальная мембрана (звездочки); ножки подоцитов (черные стрелки); фенестры эндотелиоцитов гломерулярных капилляров (белые стрелки). Ультраструктура проксимального канальца (Б). Базальные мембраны эпителиоцитов проксимальных канальцев (звездочки).

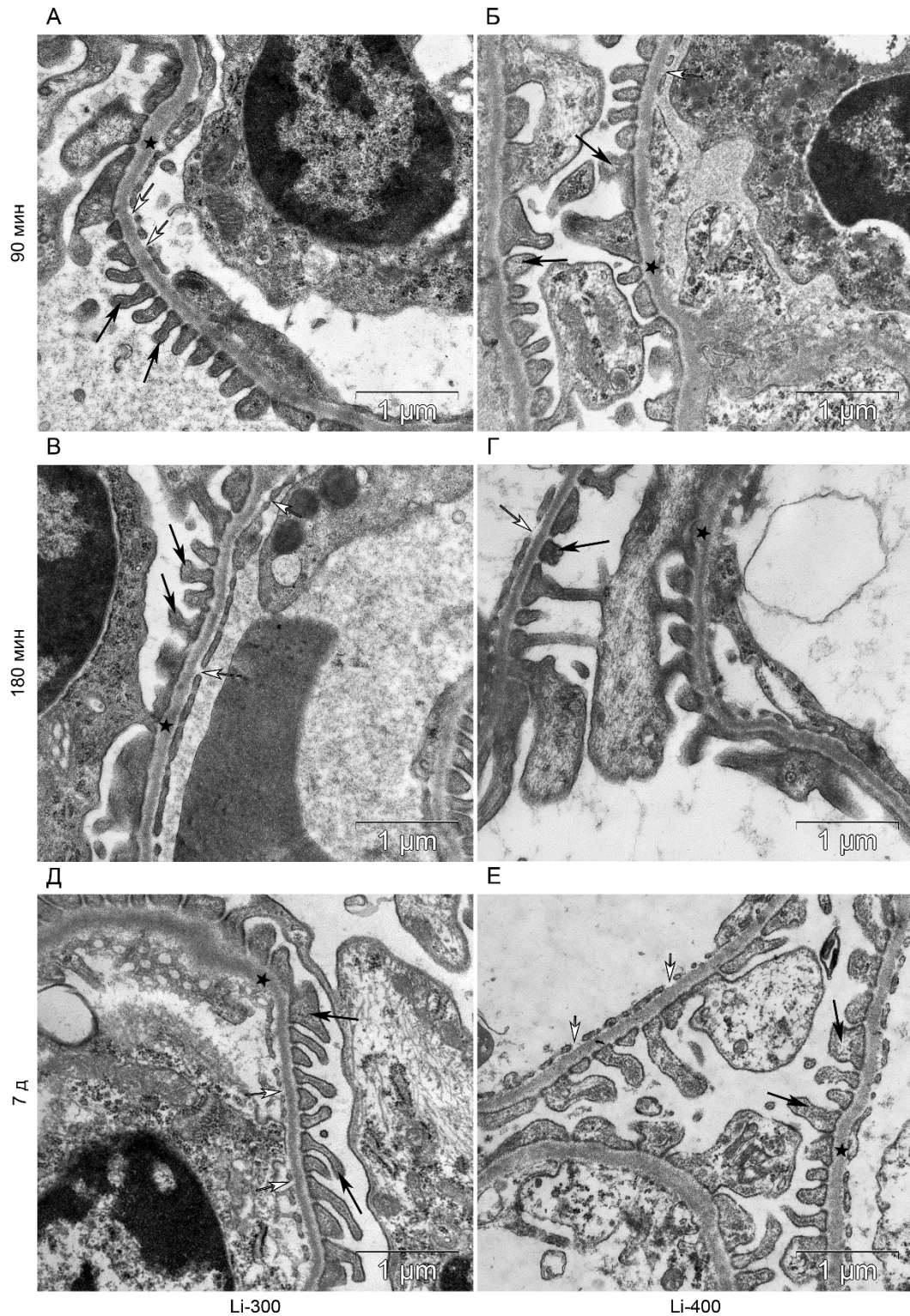


Рис. 7. Структура почечного фильтра через 90 мин (А, Б), 180 мин (В, Г) и 7 дней (Д, Е) после однократного введения карбоната лития в дозах 300 и 400 мг/кг. Гломерулярная базальная мембрана (звездочки); ножки подоцитов (черные стрелки); фенестры эндотелиоцитов гломерулярных капилляров (белые стрелки).

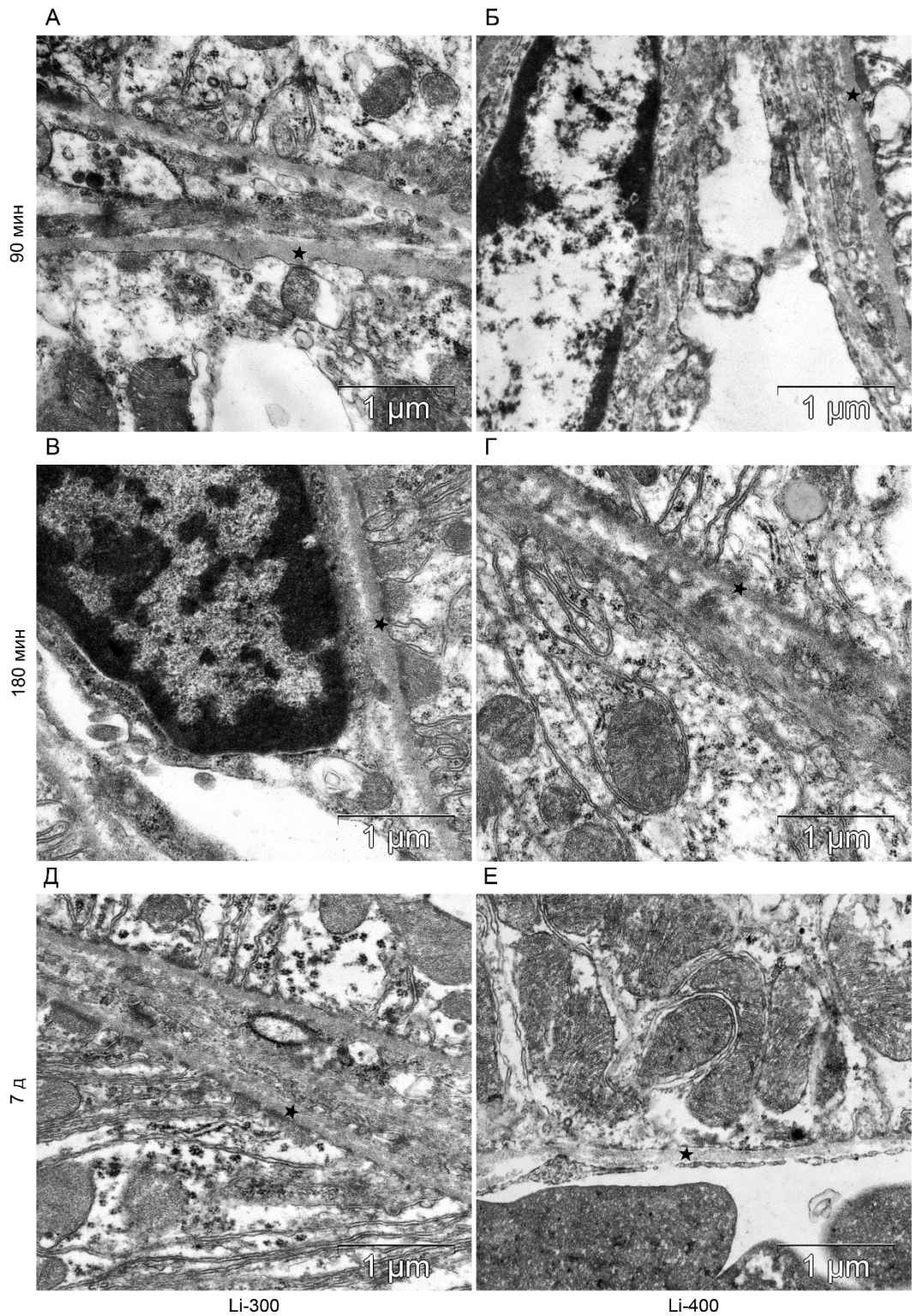


Рис. 8. Структура базальной мембраны эпителиоцитов проксимальных канальцев (звездочки) через 90 мин (А, Б), 180 мин (В, Г) и 7 дней (Д, Е) после однократного введения карбоната лития в дозах 300 и 400 мг/кг.

ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биораспределение лития: результаты и перспективы

Учитывая актуальность развития метода нейтронозахватной терапии, во всем мире активно разрабатываются способы повышения эффективности БНЗТ. Одним из подходов является синтез новых борсодержащих агентов с большим количеством атомов бора на молекулу или специфических соединений для каждого вида опухоли [42]. В связи с этим, ведутся многочисленные исследования по оценке биораспределения бора в опухоли и других органах, финальной целью которых является оптимизация плана терапии.

Предполагается, что для элиминации опухолевых клеток с помощью БНЗТ без повреждения нормальных клеток требуется селективное накопление бора в опухолевой ткани в концентрации 15–30 мкг/г атомов ^{10}B на грамм ткани опухоли [43]. Однако данные различных исследований свидетельствуют о значительной гетерогенности накопления бора в опухоли.

Так, в исследовании Caprano и соавт. было показано, что пиковые концентрации бора в опухоли наблюдались через 2 часа после введения, и колебались от 12 мкг/г до 52 мкг/г [42]. Кроме того, авторами было выявлено, что средняя концентрация БФА в опухоли составляла $25,9 \pm 2,6$ мкг/г, а соотношение концентраций опухоль/кровь и опухоль/кожа (отдаленные от опухоли участки) составило 4,3 и 2,5 соответственно, через 2 часа после инъекции 350 мг/кг БФА [42].

Zhang и соавт. исследовали накопление бора после инфузии БФА-Ф у потенциальных пациентов для БНЗТ: БФА-Ф вводили внутривенно в течение 90 минут в дозе 350 мг/кг двум пациентам и 100 мг/кг одному пациенту [35]. Максимальная концентрация бора наблюдалась сразу после окончания инфузии БФА: для дозы в 350 мг/кг – через 90 минут (концентрации в опухоли находились в диапазоне 15,59–30,05 мкг/г), а для дозы 100 мг/кг – через 135

минут (максимальная концентрация составляла 7,00 мкг/г). Соотношение опухоль/кровь для трех пациентов с меланомой находилось в пределах 1,48–3,82, а соотношение нормальная кожа/кровь – в диапазоне 0,81–1,99.

Garabalino и соавт. исследовали накопление бора в тканях опухоли у хомяков после внутривенной инфузии БКН в дозе 50 мг/кг [44]. Значения максимальной концентрации бора в опухоли варьировались от 24 до 35 мкг/г, а соотношение концентраций бора опухоль/нормальная ткань – от 1.1 до 1.8.

В данном исследовании, пиковая концентрация лития в опухоли в максимально вводимой дозе карбоната лития 400 мг/кг составляла около 22 мкг/г, таким образом, целевая расчетная концентрация в 40 мкг/г достигнута не была. Согласно литературным данным, несмотря на значительную вариабельность концентраций бора и наличие концентраций в опухоли ниже требуемых расчетных значений (20 мкг/г), зачастую проведение БНЗТ в исследованиях оказывается успешным. Кроме того, наилучшие результаты исследований БНЗТ, а также высокие концентрации бора в опухоли недавно были получены с использованием препаратов-носителей бора последнего поколения, значительно повышающих селективность его доставки в клетки опухоли: например, с использованием различного типа липосом [45, 46], полимеров [47], наночастиц [48-50], маннопиранозидных комплексов [51], и при электрохимиотерапии в сочетании с препаратом бора [52]. Учитывая, что в данном исследовании была использована соль лития – карбонат лития, при введении которой ионы лития неселективно поглощались опухолевыми клетками, можно предположить, что создание специальной конструкции с литием на основе селективного носителя, аналогично препаратам бора, существенно повысит накопление лития в опухоли.

Различия в распределении бора могут также наблюдаться при протоколе однократной инъекции и протоколе непрерывной инфузии препарата [53]. Таким образом, способ введения препарата также может оказать существенное влияние на распределение препарата, в этой связи, возможно, также

потребуется дальнейшие исследования, направленные на поиск оптимального пути введения лития.

Кроме того, в данном исследовании максимальные концентрации лития наблюдались в почках, при обеих используемых дозировках и на всех временных точках, что объясняется наибольшим участием данного органа в элиминации лития из организма [54]. Известно, что почки также традиционно имеют высокие концентрации бора, поскольку являются источником выведения бора и его метаболитов [42].

Токсичность лития

В зависимости от симптомов, обусловленных фармакокинетикой лития, различают острую (acute), острую при хронической (acute-on-chronic) и хроническую (chronic) интоксикацию литием [55]. Выведение лития осуществляется преимущественно почками в виде свободного иона с большой межиндивидуальной вариабельностью и зависит от таких факторов как возраст, общая масса тела и функция почек [56]. Было показано, что параметры веса тела и почечный клиренс креатинина точно предсказывают равновесные концентрации лития за счет снижения межиндивидуальной вариабельности [57]. В соответствии с этим, повреждение почек является одним из наиболее распространенных и хорошо охарактеризованных побочных эффектов при терапии литием, что приводит к развитию так называемой литий-индуцированной нефропатии. Известно, что характерными проявлениями нефротоксичности лития являются очаговая атрофия нефронов и интерстициальный фиброз с относительным сохранением клубочков [58].

В данном исследовании была выполнена оценка состояния почечных канальцев и фильтрационного барьера почки. Фильтрационный барьер почки включает в себя фенестрированные эндотелиальные клетки, базальную мембрану клубочков (гломерулярную мембрану), а также отростки подоцитов и щелевые диафрагмы подоцитов [59]. В результате морфологического

исследования компонентов фильтрационного барьера, а также оценки результатов PAS-реакции в почечных канальцах, можно сделать вывод, что однократное введение карбоната лития в дозах 300 и 400 мг/кг не приводит к острому повреждению почек.

По данным литературы, факторами риска развития литий-индуцированной нефропатии могут являться продолжительность лечения, возраст и предшествующие эпизоды отравления литием [60-62]. В настоящее время достоверно не известно, будет ли влиять протокол приема лития (один раз в сутки или многократные дозы) на различия в частоте развития терминальной стадии почечной недостаточности [58]. В соответствии с этим, можно предположить, что однократный прием лития с целью проведения Li-НЗТ не будет нести рисков почечного повреждения, особенно с учетом строгой стратификации пациентов по факторам риска.

Относительно безопасная пероральная доза лития для человека составляет от 450 до 1300 мг/сутки [56]. Известно, что литий обладает узким терапевтическим индексом: целевая концентрация в крови для человека варьирует от 0,5 до 1,2 ммоль/л и зависит, как правило, от скорости экскреции у конкретного пациента [63]. При этом, имеются данные, что фармакокинетика лития у людей значительно отличается от таковой у грызунов [64].

В данном исследовании максимальная концентрация лития в крови при введении доз 300 и 400 мг/кг составляла около 2,2 ммоль/л, что превышало терапевтические значения. Однако известно, что период полувыведения лития равен примерно 24 часам, а полученные C_{max} в 2,2 ммоль/л были зафиксированы через 90 минут после введения препарата, что согласуется с данными о достижении пиковых концентраций лития у человека в диапазоне 1-3 часа после перорального введения препарата [65]. Регистрация уровней лития в сыворотке крови у человека проводится, как правило, через 5-7 дней после начала лечения, при достижении равновесного состояния лития в крови

[56, 66]. При этом, известно, что умеренная токсичность лития проявляется на уровнях до 2,5 ммоль/л [40]. Учитывая все вышесказанное, а также отсутствие достоверного снижения веса экспериментальных животных и патологических изменений тканей почки на всех исследуемых сроках введения лития, можно сделать вывод об отсутствии острой токсичности лития в использованных в данной работе протоколах введения лития.

Таким образом, в данном исследовании впервые показаны параметры биораспределения лития в опухолевой ткани (меланомы кожи), а также в органах, отдаленных от опухолевого роста – головном мозге, коже, почках. Выявлены высокие концентрации лития в тканях опухоли. Впервые определены соотношения концентраций опухоль/кровь и опухоль/нормальная ткань (кожа), что будет иметь важное значение в подборе оптимального протокола проведения НЗТ. В условиях отдаленного опухолевого роста была впервые выполнена оценка острой нефротоксичности карбоната лития, показано отсутствие значимых изменений в почках после введения препарата в дозах 300 и 400 мг/кг. С учетом этого, можно заключить, что проведение Li-НЗТ является возможным, требуются дальнейшие исследования с применением ${}^6\text{Li}$ и дальнейшего облучения опухолевых клеток с использованием апробированных в данной работе схем введения лития. Кроме того, дальнейшие исследования фармакокинетики лития могут помочь оптимизировать протокол введения лития для успешного облучения опухоли.

ВЫВОДЫ

1. Максимальная концентрация (C_{\max}) лития в опухоли после введения карбоната лития в дозе 300 мг/кг составила 20,02 мкг/г, а в дозе 400 мг/кг – 22,41 мкг/г.
2. Время максимальной концентрации (T_{\max}) в опухоли после введения карбоната лития в дозе 300 мг/кг в 3 раза превышало аналогичный показатель после введения карбоната лития в дозе 400 мг/кг (90 и 30 минут, соответственно). При этом, изменений T_{\max} в коже и крови при введении разных концентраций карбоната лития не наблюдалось.
3. Значения концентрации лития для двух используемых доз через 7 дней после однократного введения препарата не отличались от фоновых значений в контрольной группе в исследованном биологическом материале, что свидетельствует о полном элиминации препарата.
4. Максимальное соотношение концентраций лития опухоль/кожа (нормальная ткань) после введения карбоната лития в дозе 300 мг/кг было достигнуто через 180 минут и составило 2,34; а в дозе 400 мг/кг – 1,47, через 30 минут после введения. Соотношение концентраций лития опухоль/кровь было максимальным на временной точке 30 минут для обеих групп и составило 1,86 (для дозы 300 мг/кг) и 2,01 (для дозы 400 мг/кг).
5. Однократные введения карбоната лития в дозах 300 и 400 мг/кг не приводили к значительному изменению структуры почечных канальцев и почечного фильтра, что свидетельствует об отсутствии острого повреждения почек после введения лития.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЭС ИСП – атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

БКН – боркапнат натрия

БНЗТ – бор-нейтронозахватная терапия

БФА – борфенилаланин

БФА-Ф – фруктозный комплекс БФА

НЗТ – нейтронозахватная терапия

Оп/Ко – соотношение опухоль/кожа

Оп/Кр – соотношение опухоль/кровь

ПЭТ/КТ – позитронно-эмиссионная томография/компьютерная томография

AUC (area under the curve) – площадь под кривой концентрация/время

AUMC (area under the moment curve) – площадь под кривой первого момента

C_{max} (maximum concentration) – максимальная наблюдаемая концентрация

Li-НЗТ (Lithium-НЗТ) – литий-нейтронозахватная терапия

M (mean) – среднее значение

PAS (periodic acid–Schiff) – периодическая кислота Шиффа

SEM (standard error of the mean) – стандартная ошибка среднего

SD (standard deviation) – стандартное отклонение

T_{max} (time to maximum concentration) – время до достижения максимальной концентрации

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Касатов Д. А. и др. Ускорительный источник эпитепловых нейтронов для бор-нейтронозахватной терапии //Вопросы атомной науки и техники. Серия: Техническая физика и автоматизация. – 2015. – №. 69. – С. 48-53.
2. Barth R. F., Mi P., Yang W. Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer //Cancer Communications. – 2018. – Т. 38. – №. 1. – С. 1-15.
3. Islami F. et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part 1: national cancer statistics //JNCI: Journal of the National Cancer Institute. – 2021. – Т. 113. – №. 12. – С. 1648-1669.
4. Forsea A. M. Melanoma epidemiology and early detection in Europe: Diversity and disparities //Dermatology Practical & Conceptual. – 2020. – Т. 10. – №. 3.
5. Glazer A. M. et al. Analysis of trends in US melanoma incidence and mortality //JAMA dermatology. – 2017. – Т. 153. – №. 2. – С. 225-226.
6. Aitken J. F. et al. Generational shift in melanoma incidence and mortality in Queensland, Australia, 1995–2014 //International journal of cancer. – 2018. – Т. 142. – №. 8. – С. 1528-1535.
7. Sneyd M. J., Cox B. A comparison of trends in melanoma mortality in New Zealand and Australia: the two countries with the highest melanoma incidence and mortality in the world //BMC cancer. – 2013. – Т. 13. – №. 1. – С. 1-9.
8. Rigel D. S. Epidemiology of melanoma //Seminars in cutaneous medicine and surgery. – WB Saunders, 2010. – Т. 29. – №. 4. – С. 204-209.
9. Davis L. E., Shalin S. C., Tackett A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment //Cancer biology & therapy. – 2019. – Т. 20. – №. 11. – С. 1366-1379.
10. Yang A. S., Chapman P. B. The history and future of chemotherapy for melanoma //Hematology/Oncology Clinics. – 2009. – Т. 23. – №. 3. – С. 583-597.
11. Pampena R. et al. New systemic therapies for cutaneous melanoma: why, who and what //Italian journal of dermatology and venereology. – 2021. – Т. 156. – №. 3. – С. 344-355.

12. Baskar R. et al. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions //International journal of medical sciences. – 2012. – T. 9. – №. 3. – C. 193.
13. Fukuda H. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for cutaneous malignant melanoma using ^{10}B -p-boronophenylalanine (BPA) with special reference to the radiobiological basis and clinical results //Cells. – 2021. – T. 10. – №. 11. – C. 2881.
14. Jenkins R. W., Fisher D. E. Treatment of advanced melanoma in 2020 and beyond //Journal of Investigative Dermatology. – 2021. – T. 141. – №. 1. – C. 23-31
15. Locher G.L. Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons // Amer. J. Roentgenol. Radium Ther. – 1936. – T. 36. – № 1. C. 1–13.
16. Barth R. F., Zhang Z., Liu T. A realistic appraisal of boron neutron capture therapy as a cancer treatment modality //Cancer Communications. – 2018. – T. 38. – №. 1. – C. 1-7.
17. Hoppenz P., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A. G. Peptide-drug conjugates and their targets in advanced cancer therapies //Frontiers in chemistry. – 2020. – C. 571.
18. Mishima Y. Neutron capture treatment of malignant melanoma using ^{10}B -chlorpromazine compound //Pigment Cell Res. – 1973. – T. 1. – C. 215-221.
19. MISHIMA Y. et al. New thermal neutron capture therapy for malignant melanoma: Melanogenesis- seeking ^{10}B molecule- melanoma cell interaction from in vitro to first clinical trial //Pigment Cell Research. – 1989. – T. 2. – №. 4. – C. 226-234.
20. Fukuda H. et al. Boron neutron capture therapy (BNCT) for malignant melanoma with special reference to absorbed doses to the normal skin and tumor //Australasian Physics & Engineering Sciences in Medicine. – 2003. – T. 26. – №. 3. – C. 97-103.
21. Hiratsuka J. et al. Long-term outcome of cutaneous melanoma patients treated with boron neutron capture therapy (BNCT) //Journal of Radiation Research. – 2020. – T. 61. – №. 6. – C. 945-951.
22. Blaumann H. R. et al. Boron neutron capture therapy of skin melanomas at the RA- 6 reactor: A procedural approach to beam set up and performance evaluation for upcoming clinical trials //Medical Physics. – 2004. – T. 31. – №. 1. – C. 70-80.

23. Menéndez P. R. et al. BNCT for skin melanoma in extremities: Updated Argentine clinical results //Applied Radiation and Isotopes. – 2009. – Т. 67. – №. 7-8. – С. S50-S53.
24. Ke G. et al. The study of physics and thermal characteristics for in-hospital neutron irradiator (IHNI) //Applied Radiation and Isotopes. – 2009. – Т. 67. – №. 7-8. – С. S234-S237.
25. Yong Z. et al. Boron neutron capture therapy for malignant melanoma: first clinical case report in China //Chinese Journal of Cancer Research. – 2016. – Т. 28. – №. 6. – С. 634.
26. Barth R. F. et al. Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer //Radiation Oncology. – 2012. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-21.
27. Shuff J. H. et al. Role of radiation therapy in cutaneous melanoma //Clinics in Plastic Surgery. – 2010. – Т. 37. – №. 1. – С. 147-160.
28. Hong A., Fogarty G. Role of radiation therapy in cutaneous melanoma //The Cancer Journal. – 2012. – Т. 18. – №. 2. – С. 203-207.
29. Archambeau JO. The effect of increasing exposures of the $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ reaction on the skin of man. //Radiology. – 1970. – Т.94. – №. 1.– С. 179-87
30. Slatkin D. N. A history of boron neutron capture therapy of brain tumours: postulation of a brain radiation dose tolerance limit //Brain. – 1991. – Т. 114. – №. 4. – С. 1609-1629.
31. Mishima Y. et al. Selective thermal neutron capture therapy and diagnosis of malignant melanoma: from basic studies to first clinical treatment //Clinical Aspects of Neutron Capture Therapy. – Springer, Boston, MA, 1989. – С. 251-260.
32. Таскаев С. Ю. Бор-нейтронозахватная терапия злокачественных опухолей: основы, история и текущее состояние //Онкологический журнал: лучевая диагностика, лучевая терапия. – 2019. – Т. 2. – №. 2. – С. 66-83.
33. Diaz A. Z. Assessment of the results from the phase I/II boron neutron capture therapy trials at the Brookhaven National Laboratory from a clinician's point of view //Journal of neuro-oncology. – 2003. – Т. 62. – №. 1. – С. 101-109.

34. Lieberman S. J. et al. Biodistribution studies of boronophenylalanine-fructose in melanoma and brain tumor patients in Argentina // *Appl. Radiat. Isot.* – 2004. – Т. 61. – С. 1095-1100.
35. Zhang Z. et al. Biodistribution studies of boronophenylalanine in different types of skin melanoma // *Applied Radiation and Isotopes.* – 2020. – Т. 163. – С. 109215.
36. Goodman J. H. et al. Boron neutron capture therapy of brain tumors: biodistribution, pharmacokinetics, and radiation dosimetry of sodium borocaptate in patients with gliomas // *Neurosurgery.* – 2000. – Т. 47. – №. 3. – С. 608-622.
37. Koivunoro H. et al. Biokinetic analysis of tissue boron (^{10}B) concentrations of glioma patients treated with BNCT in Finland // *Applied Radiation and Isotopes.* – 2015. – Т. 106. – С. 189-194.
38. Gielen M., Tiekink E. R. T. (ed.). *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine.* – John Wiley & Sons, 2005.
39. Sugita E. T. et al. Lithium carbonate absorption in humans // *The Journal of Clinical Pharmacology and New Drugs.* – 1973. – Т. 13. – №. 7. – С. 264-270.
40. Vosahlikova M. et al. Lithium—therapeutic tool endowed with multiple beneficiary effects caused by multiple mechanisms // *Acta Neurobiol Exp.* – 2016. – Т. 76. – С. 1-19.
41. Волкова О. В., Елецкий Ю. К. *Гистология с основами гистологической техники* // М.: Медицина. – 1982.
42. Carpano M. et al. Experimental studies of boronophenylalanine (10BPA) biodistribution for the individual application of boron neutron capture therapy (BNCT) for malignant melanoma treatment // *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics.* – 2015. – Т. 93. – №. 2. – С. 344-352.
43. Sumitani S. et al. Pharmacokinetics of core-polymerized, boron-conjugated micelles designed for boron neutron capture therapy for cancer // *Biomaterials.* – 2012. – Т. 33. – №. 13. – С. 3568-3577.
44. Garabalino M. A. et al. Biodistribution of sodium borocaptate (BSH) for boron neutron capture therapy (BNCT) in an oral cancer model // *Radiation and environmental biophysics.* – 2013. – Т. 52. – №. 3. – С. 351-361.

45. Takeuchi I. et al. Polyborane-encapsulated PEGylated liposomes prepared using post-insertion technique for boron neutron capture therapy //Journal of oleo science. – 2019. – T. 68. – №. 12. – C. 1261-1270.
46. Kanygin V. et al. In vitro and in vivo evaluation of fluorescently labeled borocaptate-containing liposomes //Journal of Fluorescence. – 2021. – T. 31. – №. 1. – C. 73-83.
47. Shi Y. et al. Covalent organic polymer as a carborane carrier for imaging-facilitated boron neutron capture therapy //ACS Applied Materials & Interfaces. – 2020. – T. 12. – №. 50. – C. 55564-55573.
48. Chen J. et al. Remarkable Boron Delivery Of iRGD-Modified Polymeric Nanoparticles For Boron Neutron Capture Therapy //International journal of nanomedicine. – 2019. – T. 14. – C. 8161.
49. Li L. et al. On-demand biodegradable boron nitride nanoparticles for treating triple negative breast cancer with boron neutron capture therapy //ACS nano. – 2019. – T. 13. – №. 12. – C. 13843-13852.
50. Zaboronok A. et al. Polymer-Stabilized Elemental Boron Nanoparticles for Boron Neutron Capture Therapy: Initial Irradiation Experiments //Pharmaceutics. – 2022. – T. 14. – №. 4. – C. 761.
51. Tsurubuchi T. et al. Evaluation of a Novel Boron-Containing α -d-Mannopyranoside for BNCT //Cells. – 2020. – T. 9. – №. 5. – C. 1277.
52. Garabalino M. A. et al. Electroporation optimizes the uptake of boron-10 by tumor for boron neutron capture therapy (BNCT) mediated by GB-10: a boron biodistribution study in the hamster cheek pouch oral cancer model //Radiation and Environmental Biophysics. – 2019. – T. 58. – №. 3. – C. 455-467.
53. Watanabe T. et al. Comparison of the pharmacokinetics between l-BPA and l-FBPA using the same administration dose and protocol: a validation study for the theranostic approach using [18 F]-l-FBPA positron emission tomography in boron neutron capture therapy //BMC cancer. – 2016. – T. 16. – №. 1. – C. 1-10.
54. Timmer R. T., Sands J. M. Lithium intoxication //Journal of the American Society of Nephrology. – 1999. – T. 10. – №. 3. – C. 666-674.
55. Haussmann R. et al. Treatment of lithium intoxication: facing the need for evidence //International journal of bipolar disorders. – 2015. – T. 3. – №. 1. – C. 1-5.

56. Couffignal C. et al. The pharmacokinetics of lithium //The Science and Practice of Lithium Therapy. – Springer, Cham, 2017. – C. 25-53.
57. Sproule B. A., Hardy B. G., Shulman K. I. Differential pharmacokinetics of lithium in elderly patients //Drugs & aging. – 2000. – T. 16. – №. 3. – C. 165-177.
58. Gitlin M. Lithium side effects and toxicity: prevalence and management strategies //International journal of bipolar disorders. – 2016. – T. 4. – №. 1. – C. 1-10.
59. Ichinose K. et al. Podocyte foot process width is a prediction marker for complete renal response at 6 and 12 months after induction therapy in lupus nephritis //Clinical Immunology. – 2018. – T. 197. – C. 161-168.
60. Aiff H. et al. Effects of 10 to 30 years of lithium treatment on kidney function //Journal of psychopharmacology. – 2015. – T. 29. – №. 5. – C. 608-614.
61. Bocchetta A. et al. Renal function during long-term lithium treatment: a cross-sectional and longitudinal study //BMC medicine. – 2015. – T. 13. – №. 1. – C. 1-7.
62. Clos S. et al. Long-term effect of lithium maintenance therapy on estimated glomerular filtration rate in patients with affective disorders: a population-based cohort study //The Lancet Psychiatry. – 2015. – T. 2. – №. 12. – C. 1075-1083.
63. Sheikh M. et al. Advances in Therapeutic Monitoring of Lithium in the Management of Bipolar Disorder //Sensors. – 2022. – T. 22. – №. 3. – C. 736.
64. O'Donnell K. C., Gould T. D. The behavioral actions of lithium in rodent models: leads to develop novel therapeutics //Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2007. – T. 31. – №. 6. – C. 932-962.
65. Malhi G. S. et al. The science and practice of lithium therapy //Australian & New Zealand Journal of Psychiatry. – 2012. – T. 46. – №. 3. – C. 192-211.
66. Dodds G. Lithium therapy //Scottish Medical Journal. – 2000. – T. 45. – №. 6. – C. 171-173.