

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДКОЖНЫХ КСЕНОГРАФТОВ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА U-87 MG ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ЭПИТЕПЛОВЫМИ НЕЙТРОНАМИ

^{1,2}Каныгин В.В., ^{2,4}Колдышева Е.В., ^{2,3}Завьялов Е.Л., ^{2,3}Соловьева О.И.,
²Каныгин Н.В., ⁴Капустина В.И.

¹Институт ядерной физики имени Г.И. Будкера Сибирского отделения РАН, ²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, ³Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, ⁴Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия, e-mail: kanigin@mail.ru

Для цитирования:

Каныгин В.В., Колдышева Е.В., Завьялов Е.Л., Соловьева О.И., Каныгин Н.В., Капустина В.И. Морфологическое исследование подкожных ксенографтов глиобластомы человека U-87 MG после локального облучения эпитепловыми нейтронами. Морфологические ведомости. 2024; 32(1):856. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2024.32\(1\).856](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2024.32(1).856)

Резюме. В настоящее время для лечения злокачественных опухолей все чаще используется бор-нейтронозахватная терапия. Этот метод эффективен в отношении радиорезистентных опухолей и новообразований, плохо поддающихся традиционным методам лечения, однако вопрос повышения его результативности остается высоко актуальным. Цель исследования – изучить структуру подкожных ксенографтов глиобластомы человека U-87 MG после локального облучения эпитепловыми нейтронами и/или на фоне введения борсодержащих веществ боркаптата и борфенилаланина. Использовали 60 иммунодефицитных мышей линии SCID с гетеротопическими ксенографтами клеток глиобластомы человека U-87 MG. Установлено, что после проведенной терапии во всех группах животных к 7-м суткам наблюдалось снижение массы опухоли по сравнению с контрольной группой, к 14 суткам этот показатель был также несколько ниже и только сочетанное введение боркаптата и борфенилаланина с последующим облучением приводило к достоверному снижению этого показателя на 31% ($p < 0,01$). Объемы опухолевого узла к 7 суткам были выше по сравнению с начальными показателями в 2 раза, к 14 суткам рост объемов опухоли снижался в среднем в 1,25 раза во всех исследованных группах. Наиболее заметные морфологические изменения по сравнению с не лечеными животными отмечены в группе животных, получавшей оба препарата бора с последующим облучением эпитепловыми нейтронами. У них отмечалось снижение пролиферативной активности опухолевых клеток и количества кровеносных сосудов, очаги некроза были мельче, как и опухолевые узлы в целом. Полученные данные свидетельствуют о том, что использованные методы лечения животных вызывают терапевтический патоморфоз, но не способны полностью остановить рост опухоли. Наиболее выраженный эффект, полученный в случае применения двух препаратов в сочетании с последующим облучением эпитепловыми нейтронами, косвенно указывает на возможный их синергический эффект, скорее всего обусловленный повышением суммарной дозы бора в опухолевых клетках.

Ключевые слова: глиобlastoma, ксенографт, борфенилаланин, боркаптат, эпитепловые нейтроны

Статья поступила в редакцию 17 января 2024

Статья принята к публикации 18 июня 2024

MORPHOLOGICAL STUDY OF HUMAN U-87 MG GLIOBLASTOMA SUBCUTANEOUS XENOGRAFTS AFTER LOCAL IRRADIATION BY EPITHERMAL NEUTRONS

^{1,2}Kanygin VV, ^{2,4}Koldysheva EV, ^{2,3}Zav'yalov EL, ^{2,3}Solov'yova OI, ²Kanygin NV,
⁴Kapustina VI

¹Budker Institute of Nuclear Physics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ²Novosibirsk National Research State University, ³Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
⁴Federal Research Center of the Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia, e-mail: kanigin@mail.ru

For the citation:

Kanygin VV, Koldysheva EV, Zav'yalov EL, Solov'yova OI, Kanygin NV, Kapustina VI. Morphological study of human U-87 MG glioblastoma subcutaneous xenografts after local irradiation by epithermal neutrons. *Morfologicheskie Vedomosti – Morphological newsletter*. 2024;32(1):856. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2024.32\(1\).856](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2024.32(1).856)

Summary. Currently, boron neutron capture therapy is increasingly used to treat malignant tumors. This method is effective against radioresistant tumors and neoplasms that are poorly amenable to traditional treatment methods, but the issue of increasing its effectiveness remains highly relevant. The aim of the study was to study the structure of subcutaneous xenografts of human glioblastoma U-87 MG after local irradiation with epithermal neutrons and/or against the background of treatment with boron-containing substances - borocaptate and boron phenylalanine. Sixty immunodeficient SCID mice with heterotopic xenografts of human glioblastoma U-87 MG cells were used. It was found that after the therapy in all groups of animals by the 7th day there was a decrease in the tumor mass compared to the control group, by the 14th day this indicator was also slightly lower and only the combined administration of borocaptate and boronophenylalanine followed by irradiation led to a reliable decrease in this indicator by 31% ($p < 0.01$). The volumes of the tumor node by the 7th day were 2 times higher than the initial indicators, by the 14th day the growth of the tumor volume decreased on average by 1.25 times in all the studied groups. The most noticeable morphological changes compared to untreated animals were noted in the group of animals that received both boron preparations followed by irradiation with epithermal neutrons. They had a decrease in the proliferative activity of tumor cells and the number of blood vessels, the foci of necrosis were smaller, as were the tumor nodes in general. The obtained data indicate that the methods of animal treatment used cause therapeutic pathomorphosis, but are not able to completely stop tumor growth. The most pronounced effect obtained in the case of using two drugs in combination with subsequent irradiation with epithermal neutrons indirectly indicates their possible synergistic effect, most likely due to an increase in the total dose of boron in tumor cells.

Key words: glioblastoma, xenograft, boron phenylalanine, borocaptate, epithermal neutrons

Article received 17 January 2024

Article accepted 18 June 2024

Введение. Глиобластома является наиболее распространенной злокачественной первичной опухолью головного мозга у взрослых. Эта опухоль известна агрессивным диффузным инфильтративным и инвазивным ростом. Особенностью глиобластом также является их выраженная морфологическая и молекулярная гетерогенность. Все эти факты обуславливают неблагоприятный прогноз для пациента, что еще больше осложняется трудностями, связанными с резекцией и последующей лучевой и химиотерапией. В связи с этим представляется важным исследование модельной опухоли и ее поведения в ответ на новые методы терапии. В свою очередь, качественное исследование и интерпретация, приводящие к появлению новых решений, требуют наличия адекватной модели – способной *in vivo* максимально приближенно воспроизвести основные звенья патогенеза этого заболевания и реакцию сформированного опухолевого узла на лечение. Для этого существует ряд методов, среди которых наибольшее распространение получили такие, как введение в организм генетических мутаций, индуцирующих развитие опухолей [1] и метод спонтанной индукции опухолевого процесса путем воздействия на организм различных химических веществ или физических факторов [2]. Основным недостатком этих моделей является непредсказуемость появления новообразования, что делает такой подход менее пригодным для практического использования в эксперименте. На наш взгляд, наиболее удачным и перспективным путем получения заданной опухоли является метод ксенотрансплантации опухолевых клеток иммунодефицитным лабораторным животным. Этот способ позволяет *in vivo* оценить токсичность и избирательность использованных веществ, а также эффективность противоопухолевой терапии.

В настоящее время для создания модели глиом человека чаще всего используются такие перевиваемые клеточные линии, как U-87, U251, U373 и другие, полученные из первичных клеток опухоли человека, которые трансплантируются в головной мозг мышей для создания ор-

тотопического ксенотрансплантата или подкожно для создания гетеротопического ксенотрансплантата. Внутримозговой трансплантат наиболее максимально имитирует характер роста опухоли и ее окружения, однако имплантация сопровождается побочными эффектами, связанными с кровоизлиянием, а период наблюдения за животными ограничен, в связи с быстрой гибелью животных в результате объемного воздействия опухоли на головной мозг. Гетеротопическая модель опухоли позволяет не только увеличить период наблюдения за исследуемым видом терапии, но и проводить локальное облучение опухоли (при инокуляции опухолевого трансплантата в теле животного), исключая при этом облучение соседних органов. Однако стоит заметить, что существующие модели глиомы, полученные у лабораторных мышей, неточно воспроизводят неоднородную и высоко инвазивную природу этой злокачественной формы опухоли мозга, что является одним из препятствий для поиска эффективных способов терапии [3-5].

Одним из перспективных методов лечения пациентов с глиобластомой является бор-нейтронозахватная терапия (далее - БНЗТ). Метод основан на ядерной реакции, где ядро ^{10}B поглощает тепловой нейтрон и мгновенно испускает в противоположных направлениях ядро лития-7 и альфа-частицу с выделением 2,79 МэВ энергии. Объединенный пробег волны реакции равен примерно 12-13 мкм, что соответствует размеру клеток млекопитающих. Этот метод имеет высокую привлекательность за счет избирательного воздействия непосредственно на клетки злокачественных опухолей, а также получаемого типа облучения с высоко линейной передачей энергии, которое эффективнее повреждает ДНК радиорезистентных клеток опухолей из-за отсутствия «кислородного эффекта» по сравнению с видами облучения с низко линейной передачей энергии, как например, с фотонной терапией, используемой в традиционной радиотерапевтической практике [6]. Избирательное накопление ^{10}B внутри клеток опухоли и последующее облучение эпитепловыми нейтронами должно

приводить к разрушению только опухолевых клеток. При этом окружающие здоровые клетки не должны подвергаться повреждающему воздействию облучения [6]. БНЗТ подходит для лечения распространенных опухолей, поскольку доза облучения от нейтронов минимальна и не воздействует пагубно на нормальные ткани, а весь эффект от терапии сосредотачивается в раковых клетках. Считается, что метод БНЗТ применим и эффективен при прогрессирующих или метастатических опухолях, когда исчерпаны возможности адъювантной терапии, при опухолях, инфильтрирующих нервную ткань, кость и иные ткани, не позволяющие выполнить достаточную радикальную хирургическую операцию, при преодолении радиорезистентности опухолей [9].

Успех БНЗТ зависит от достаточно-го количества тепловых нейтронов в зоне облучения и целевой доставки ^{10}B в опухолевые ткани ($\sim 10^9$ атомов в клетке, соотношение концентраций бора опухоль/кровь и опухоль/нормальная ткань больше 3/1). До недавнего времени единственными источниками нейтронов для БНЗТ являлись ядерные реакторы, однако в последнее время вектор сместился на разработку ускорительных источников нейтронов, которые стали использоваться для проведения БНЗТ [7].

Для оценки радиобиологических эффектов БНЗТ при исследованиях *in vitro* и *in vivo* проводится как первоначальная оценка цитотоксического эффекта препаратов бора, так и последующее сравнение дозозависимых цитотоксических эффектов компонентов пучка нейтронов и непосредственно реакции бор-нейтронного захвата. Проведенные исследования БНЗТ глиальных опухолей, смоделированных *in vitro* на реакторах [8-11] и ускорителях [12] показали свою эффективность в отношении глиобластомы.

Первое успешное лечение модели опухоли головного мозга (глиосаркомы крысы 9L) было проведено Джоэлом и соавт. в конце 1980-х годов с использованием димерной формы BSH в качестве агента захвата бора и пучка тепловых нейтронов BMRR [31]. За этим последовало другое исследование, включавшее БНЗТ

глиосаркомы 9L у крыс с использованием борфенилаланина (далее – ВРА) [30]. Эти эксперименты были повторены с использованием улучшенной системы доставки ВРА, состоящей из комплекса ВРА с фруктозой (ВРА-F) для увеличения растворимости. Это привело к тому, что долгосрочная выживаемость животных без опухолей приближалась к 100% [32]. Дополнительные исследования БНЗТ с ВРА Saris et al. [33] и Matalaka et al. [34] мышинной глиомы GL 261, имплантированной в мозг крыс линии Nude, также продемонстрировали эффективность метода. Повышение эффективности терапии в отношении ингибирования роста опухоли F98 были достигнуто при использовании комбинации ВРА и боркаптата (далее – BSH) с использованием маннитола для временного преодоления гематоэнцефалического барьера [29]. Современные исследования БНЗТ на моделях ортотопических и гетеротопических ксенотрансплантатов глиобластомы человека у иммунодефицитных мышей на актуальных ускорительных источниках нейтронов, продемонстрировали не только эффективность данного метода в преодолении радиорезистентности этого вида опухоли, но и возможности усовершенствования метода путем комбинирования агентов доставки B^{10} и необходимость использования фракционирования [13-17].

Клинические исследования по БНЗТ глиальных опухолей начались на базе Брукгейвского реактора с 1951 года, где в качестве агента ^{10}B использовались бура и пентаборат натрия. Однако результаты выживаемости мало отличались от аналогичных групп пациентов при использовании стандартных способов лечения, что, по-видимому, было связано с неселективным и недостаточным накоплением ^{10}B в опухоли, а также неадекватными характеристиками пучка нейтронов [6]. Первые обнадеживающие результаты применения БНЗТ у пациентов с глиобластомой были получены Hatanaka с коллегами в Японии, проводившими интраоперационное облучение тепловыми нейтронами на реакторе Hitachi с использованием в качестве агента доставки бора BSH $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$, обо-

гащенного ^{10}B [6]. Было высказано предположение, что транспорт BSH из крови в опухолевые клетки происходит за счет нарушения гематоэнцефалического барьера в области опухоли. Согласно этой гипотезе, при контакте с опухолевыми клетками он проникает в клетки и даже обнаруживается в цитоплазме и ядре клеток глиомы [18-19]. Более поздние наблюдения [20-21] ставят под сомнение эту гипотезу, но не дают иного убедительного объяснения. Во многих исследованиях с различными вариантами моделей опухоли были показаны достаточно противоречивые результаты по динамике накопления препарата BSH в опухоли и отмечена тенденция быстрого вымывания препарата из опухоли после введения. Имеются публикации об успешной БНЗТ с использованием BSH на моделях глиомы у мышей [22-24] и крыс [25-26].

Последующие клинические исследования по БНЗТ глиальных опухолей проводились в Финляндии на реакторе FIR1, в Японии на реакторах JRR-4 и KUR и в Тайване на реакторе THOR с использованием более селективного агента доставки бора – L-p-BPA, обогащенного ^{10}B [6]. Селективность накопления BPA в опухолевых клетках обусловлена наличием в составе аминокислоты аланина, которая активно метаболизируется опухолевыми клетками. Механизм транспорта BPA через клеточную мембрану исследовали *in vitro* на клетках глиосаркомы крысы. Результаты этого исследования подтверждают гипотезу о том, что BPA активно транспортируется через L-систему, и может дополнительно стимулироваться аминокислотами, предварительно накопленными в клетке [27].

Проводились лабораторные исследования BSH и BPA, направленные на выявление приемлемой дозировки препарата для достижения терапевтического эффекта БНЗТ и выяснения способа их введения для снижения токсичности. Джозл и др. исследовали влияние дозы, времени и способа инфузии на доставку комплекса BPA-F крысам с глиосаркомой в дозах от 250 до 1000 мг/кг. Более высокие концентрации и время инфузии позволили достигнуть концентрации бора в

опухоли до 70 ppm при постоянном соотношении опухоль/кровь 3,7, а интракаротидная инфузия BPA-F изменила соотношение концентрации бора опухоль/кровь до 5,0 при концентрации 38 ppm в опухоли [28]. Барт и др. исследовали разницу между внутривенной и интракаротидной инъекцией BPA и эффект нарушения гематоэнцефалического барьера после введения 25% раствора маннита через внутреннюю сонную артерию крысам с глиомой F-98 и показали, что интракаротидное введение BPA повышает концентрацию бора в опухоли, что приводит к более высокой дозе облучения опухоли и улучшению выживаемости [29].

BPA и в значительно меньшей степени BSH до сих пор широко используются в клинических исследованиях БНЗТ на ускорительных источниках нейтронов, установленных в клиниках Японии, Южной Кореи и Китая [7]. В результате многочисленных исследований были выведены рекомендуемые терапевтические дозы для клинического применения BSH (100 мг/кг) и BPA (от 500 до 750 мг/кг) [7]. Стеборонин (Борофалан) производства Stella Pharma, аналогичный BPA, был впервые одобрен в качестве средства для лечения в Японии в 2020 году. В Китае препарат, аналогичный BPA, производится компанией Neuboron Medtech Ltd и используется в доклинических исследованиях с 2022 года и одобрен к клиническому применению в 2023 году [7]. Медиана выживаемости пациентов с глиобластомой по данным клинических исследований БНЗТ на ядерных реакторах составляет до 27,1 месяца, тогда как при традиционной терапии медиана выживаемости пациентов по данным 2022 года составляет в среднем 17 месяцев [7].

Исследования по БНЗТ продолжаются по нескольким направлениям. Прежде всего выясняется на сколько влияет увеличение дозы исследуемых веществ на концентрацию в определенных тканях и состояние органов *in vivo*. Не менее существенным аспектом являются работы по получению максимально свободных от посторонних примесей борсодержащих веществ. И, наконец, прово-

дится оценка радиобиологических эффектов для различных типов тканей и опухолей у животных для использования этих данных в планировании терапии при проведении клинических исследований.

Цель исследования: изучить морфологические особенности подкожных ксенографтов глиобластомы человека U-87 MG у лабораторных мышей после локального облучения эпителиковыми нейтронами и/или на фоне борсодержащих веществ (BSH и BPA).

Материалы и методы исследования. В эксперименте использовали 60 иммунодефицитных мышей линии SCID с SPF-статусом здоровья, массой тела 23-25 г, без разделения по полу. Мыши были получены из SPF-вивария Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (Новосибирск). В возрасте 6 недель животным подкожно инокулировали 100 мкл суспензии клеток глиобластомы человека U-87 MG по 5 млн клеток на мышь. Клетки глиобластомы человека U-87 MG (ATCC® HTB-14™) получены из коллекции центра коллективного пользования SPF-вивария Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (Новосибирск).

Через 2 недели после инокуляции опухолевых клеток мыши были разделены на 5 групп по 12 животных в каждой. Животные 1-й группы получали 0,9% р-р NaCl; 2-й – 0,9% р-р NaCl и локальное облучение; 3-й – однократное введение BSH (100 мг/кг) и облучение; 4-й – BPA (700 мг/кг) и облучение; 5-й – BSH (100 мг/кг) и BPA (700 мг/кг) с облучением. В исследовании были использованы терапевтические дозы BSH (100 мг/кг) и BPA (700 мг/кг), а также терапевтические параметры (2,6 мАч) и флюенс нейтронов для одного сеанса облучения [6].

Забор опухолевого узла проводили на 7 и 14 сутки после БНЗТ. Из эксперимента животных выводили декапитацией, опухолевый узел с подкожной клетчаткой аккуратно вырезали, измеряли и взвешивали, после чего рассекали пополам и фиксировали в 10% нейтральном формалине. Проводку, осуществляли в аппарате

STP – 120 (Microm GmbH, Walldorf, Germany). Срезы, толщиной 2-3 мкм получали на ротационном микротоме HM 325 (Thermo Fisher Scientific, Runcorn, UK). После стандартной процедуры депарафинизации и дегидратации срезы окрашивали гематоксилином и эозином в комбинации с реакцией Перлса. Для оценки состояния компонентов соединительной ткани проводилось окрашивание по методу Ван-Гизон. Исследование проводили с использованием универсального микроскопа Leica DM 4000B, микрофото получали с помощью цифровой фотокамеры Leica DFC 230 и компьютерной программы Leica QWin3 (Leica Microsystem, Cambridge, UK). Для сравнения средних применяли *t* критерий Стьюдента, значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. Сканы для анализа получали с помощью сканера MAGSCANNER KF-PRO-005-EX (Yuyao Technology Innovation Center, Zhejiang, China). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Результаты и обсуждение. При исследовании воздействия пучка нейтронов как в виде моноагента, так и в сочетании с борсодержащими веществами (BSH и BPA) ни одно животное не погибло. Достоверного изменения массы тела животных в отсроченном периоде не зарегистрировано. До 14 суток наблюдения отмечен рост массы и объема опухоли во всех группах после БНЗТ. Однако, по сравнению с опухолями у животных контрольной группы, не получавших лечения и облученных потоком нейтронов без использования борсодержащих препаратов, в группах после БНЗТ на 7 сутки масса опухоли была ниже в среднем на 14-31%. Полученный эффект снижения массы опухоли отражает эффективность проводимой БНЗТ в отношении глиобластомы человека начиная с 7 дня после проведенной терапии. К 14 суткам масса опухолей у животных, после БНЗТ с использованием BSH или BPA достоверно не отличались от контрольных значений. Исключение составили показатели 5-й группы, которой вводили в сочетании с облучением оба борсодержащих

вещества. В ней по сравнению с группой контроля к 14-м суткам показатель был ниже на 31% ($p<0,05$). Полученные результаты можно объяснить относительно равной эффективностью препаратов в стандартных дозировках, использованных ранее в клинической практике [6]. Однако эффект полного подавления роста опухо-

ли при использовании этих препаратов в качестве монотерапии в стандартных дозах не был достигнут вероятно в связи с низкой концентрацией бора в опухоли во время сеанса облучения, равно как и эффект облучения эпителизовыми нейтронами в виде монотерапии (таблица 1). Объем

Таблица 1

Динамика параметров опухолевого узла у мышей SCID после БНЗТ с BSH и ВРА и их сочетанного применения ($M\pm m$)

Показатель	1 группа		2 группа		3 группа		4 группа		5 группа	
	Время после введения веществ									
	7 сутки	14 сутки	7 сутки	14 сутки	7 сутки	14 сутки	7 сутки	14 сутки	7 сутки	14 сутки
Масса тела, г	25,7±0,9	25,7±1,2	24,0±1,8	24,9±1,3	24,3±1,6	26,5±1,3	24,3±0,9	26,3±0,8	23,4±1,4	25,8±1,4
Начальный объем опухоли, мм³	484±88	447±42	326±92	682±94	386±67	501±39	425±113	456±66	438±81	569±92
Конечный объем опухоли, мм³	1112±181	1648±290	689±149	1307±135	808±123	1821±151	908±123	1700±199	756±121	1629±333
Масса опухоли, г	0,90±0,0	1,30±0,2	0,60±0,1	1,50±0,1	0,63±0,1	1,22±0,1	0,77±0,1	1,12±0,1	0,62±0,1	0,90±0,1
Относительная масса опухоли, мг/г	36,5±5,5	50,51±6,6	26,6±6,4	46,8±3,8	27,6±5,7	46,2±4,2	31,8±3,8	43,0±4,6	26,4±4,1	35,4±6,8

опухолевого узла на 7-е сутки после начала лечения достоверно ($p<0,01$) увеличился во всех группах в среднем в 2 раза, по сравнению с начальными показателями, к 14 суткам его рост достоверно замедлялся до 1,25 раза, по сравнению с 7 сутками, для групп животных после БНЗТ, тогда как для контрольной группы не менялся. Наиболее выраженный эффект отмечался при сочетанном применении борсодержащих веществ и последующего облучения. Это свидетельствует о возмож-

ности использования в клинической практике комбинации этих препаратов, как одного из методов повышения эффективности БНЗТ. Гистогенетически, как указывает производитель, использованная нами культура клеток U-87 MG относится к глиомам, с эпителиальной морфологией. К моменту морфологического исследования опухоль была представлена у мышей сформированным под кожей на бедре опухолевым узлом различных размеров.

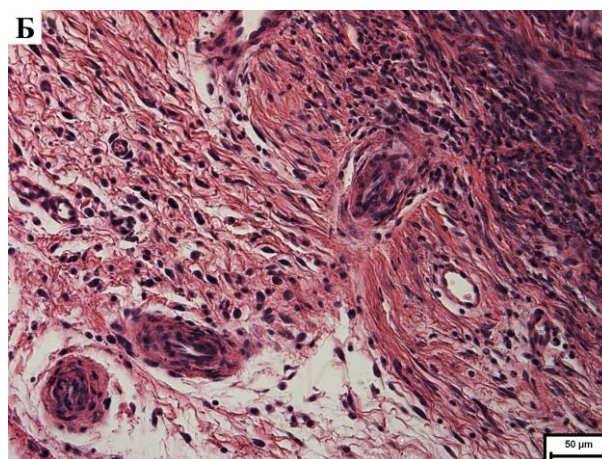
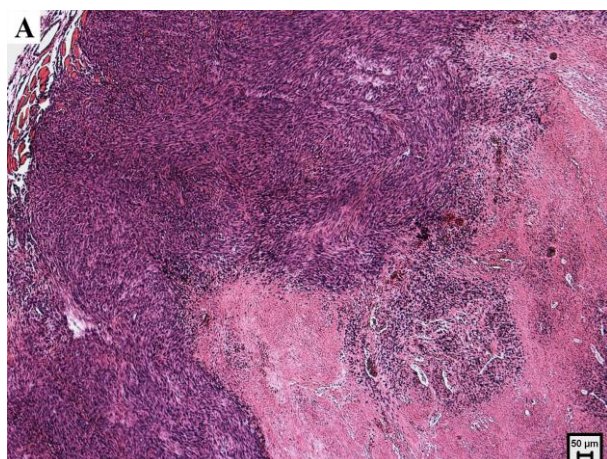


Рис. 1. Микрофото препарата фрагмента опухолевого узла подкожного ксенографта глиобластомы человека U-87 MG мыши SCID через 7 суток после инокуляции. Окр.: гематоксилином и эозином. Обозначения: А – фрагмент капсулы, ув.: $\times 100$. Б – выраженное утолщение стенок и рост сосудов, ув.: $\times 400$

Во всех исследуемых группах новообразование имело неровные края и было покрыто плотной соединительнотканной капсулой (рис. 1-А). Опухолевые клетки, внедряясь в мышечную ткань и формируя опухолевый узел приводили к расплавлению мышечных волокон (рис. 4-А). Центральная область опухолевого узла во всех группах кроме 5-й была представлена обширным сливным некрозом. К 7 суткам область некроза была инфильтрирована мононуклеарными клетками, формировавшими широкий вал, к 14 суткам инфильтрат выглядел значительно истонченным и фиксировался лишь фрагментарно, особенно это было заметно в группе, в которой животные не получали никакого лечения (рис. 1-А).

Во всех группах опухоли характеризовались высокой клеточностью, выра-

женной атипией опухолевых клеток и их полиморфизмом по размеру и форме. Опухолевые узлы во всех случаях были сформированы двумя различающимися пулами клеток. Одним – с округлыми клетками с более светлой цитоплазмой (эпителиоидными), часто с гиперхромным округлым ядром, иногда цитоплазма этих клеток выглядела опустошенной, ядро – гомогенизированным. Другим – с веретенообразными (саркоматоидными) клетками с овальными, часто нормохромными ядрами, формировавшими плотные разнонаправленные тяжи (рис. 2-А). Эпителиоидные клетки, демонстрировали заметный полиморфизм по размерам и атипию, нередко эти клетки формировали псевдофолликулы между тяжами или по периферии опухоли.

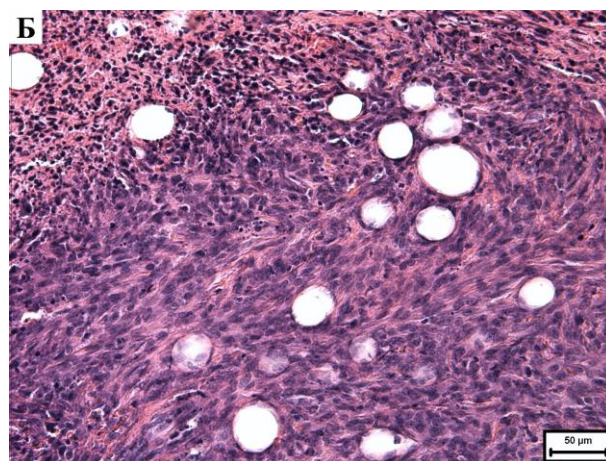
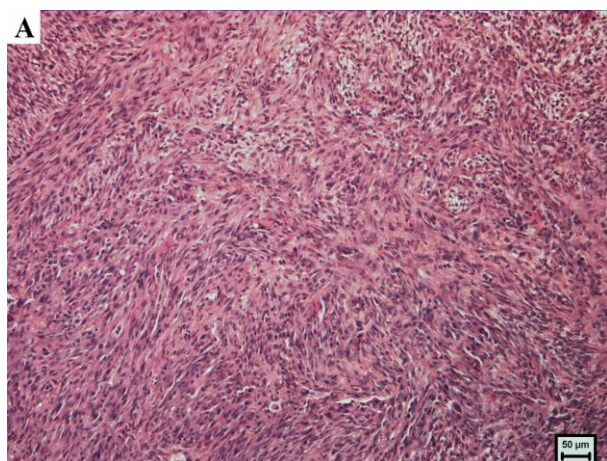


Рис. 2. Микрофото препарата фрагмента опухолевого узла подкожного ксенографта глиобластомы человека U-87 MG мышцы SCID через 14 суток после инокуляции. Окр.: гематоксилином и эозином. Обозначения: А – фрагмент опухоли, ув.: x100. Б – тонкостенные сосуды, ув.: x200

У всех групп животных в центре опухолевого узла располагался варьирующий по размеру очаг некроза и только в группе животных, получавших БНЗТ с двумя борсодержащими веществами, формировались более мелкие некротические очаги, чаще 2-3, сами опухолевые узлы в этой группе также были мельче (рис. 4-Б). Диффузно по всему опухолевому узлу наблюдались множественные митозы, свидетельствующие в пользу роста опухоли, особенно заметно это становилось к 14 суткам эксперимента. Эти клетки переме-

жались с большим количеством гетерогенных по размеру сосудов, что может свидетельствовать в пользу процессов активной неоваскуляризации (рис. 1-Б, 2-Б). Следует отметить, что по периферии опухолевого узла встречались преимущественно сосуды округлой формы с тонкой стенкой (рис. 2-Б), реже и в более глубоких слоях опухоли наблюдались сосуды с утолщенной стенкой, что было обусловлено пролиферацией эндотелия (рис. 1-Б). У животных после БНЗТ с двумя борсодержащими агентами также сохранялось

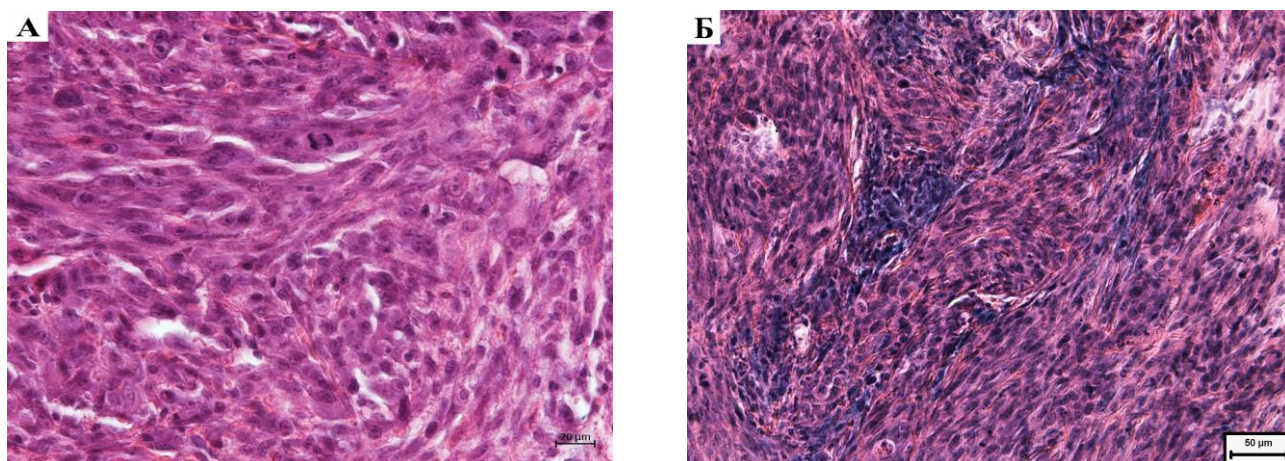


Рис. 3. Микрофото препарата фрагмента опухолевого узла подкожного ксенографта глиобластомы человека U-87 MG мыши SCID после инокуляции и лечения. Обозначения: А через 14 суток после инокуляции и лечения БНЗТ с введением ВРА. Окр.: гематоксилином и эозином. Ув.: $\times 400$. Б – через 7 суток после инокуляции и облучения эпитепловыми нейтронами. Окр.: гематоксилином и эозином с докрасиванием по Перлсу. Ув.: $\times 200$

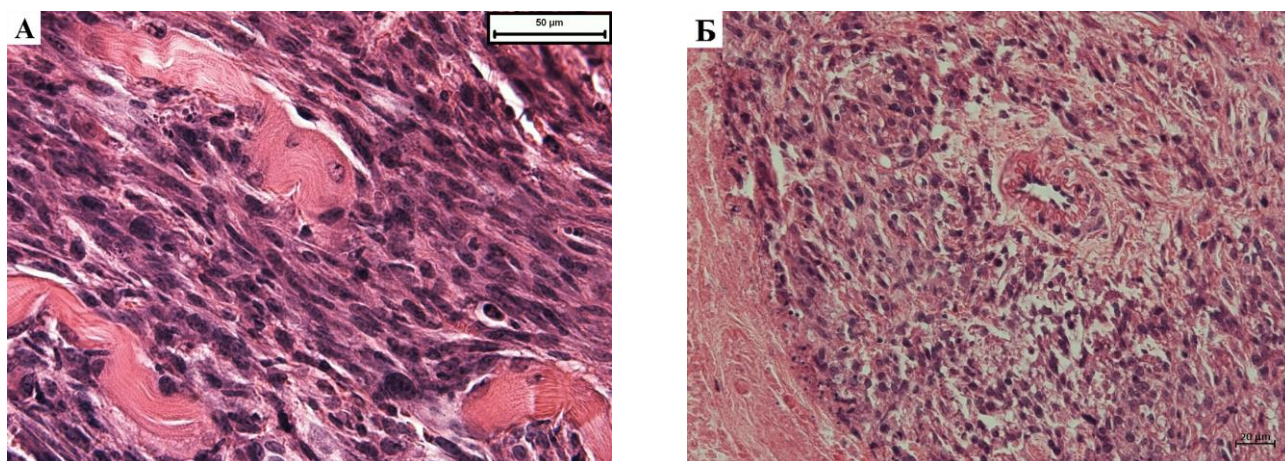


Рис. 4. Микрофото препарата фрагмента опухолевого узла подкожного ксенографта глиобластомы человека U-87 MG мыши SCID через 14 суток после инокуляции. Окр.: гематоксилином и эозином. Обозначения: А – без лечения, частичное расплавление мышечных. Ув.: $\times 400$. Б – с лечением БНЗТ и введением ВРА и BSH, формирование опухолевыми клетками муфты вокрун крупного сосуда. Ув.: $\times 200$

умеренное количество митотически делящихся клеток (рис. 3-А). Нередко в опухолях выявлялись кровоизлияния, диапедезные явления, при этом чаще всего это наблюдалось в тех случаях, когда в качестве лечения применяли моноагентное облучение (рис. 3-Б).

Заключение. Таким образом, ксенографты клеточной линии человека U-87 MG во всех исследованных группах демонстрировала признаки глиобластомы: все опухоли характеризовались высокой клеточностью, выраженной атипией опухолевых клеток, полиморфизмом ядер. Цен-

тральные области были представлены в большинстве случаев обширной зоной некроза, окруженной лейкоцитарным валом, который истончался и фрагментировался по мере увеличения срока эксперимента. Во всех новообразованиях выявлялось большое количество сосудов: крупные и полнокровные чаще всего встречались ближе к зоне некроза, там же встречались и более мелкие сосуды с утолщенной в результате гиперплазии эндотелиоцитов стенкой. Наиболее многочисленными были округлые сосуды с тонкой стенкой и существенно различавшиеся по

диаметру. Наиболее выраженный терапевтический эффект наблюдался в случае применения БНЗТ с двумя борсодержащими веществами, что выражалось в сни-

жении количества митотически делящихся клеток, снижении скорости роста массы и объема опухолевого узла, а также снижении уровня васкуляризации.

Литература References

1. Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, et al. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: Convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer cell*. 2002;1(3):269-277
2. Vitorino JD, Costa PM. After a Century of Research into Environmental Mutagens and Carcinogens, Where Do We Stand. *Int J Environ Res Public Health*. 2023;20(2):1040. <https://doi.org/10.3390/ijerph20021040>
3. Becher OJ, Holland EC, Sausville EA, Burger AM. Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Res*. 2006;66(7):3355-3359
4. Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. Chemoradiotherapy in Malignant Glioma: Standard of Care and Future Directions. *J Clin Oncol*. 2007;25(26):4127-4136. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.8554>
5. Jagtap S, Meganathan K, Wagh V, et al. Chemoprotective Mechanism of the Natural Compounds, Epigallocatechin-3-O-Gallate, Quercetin and Curcumin against Cancer and Cardiovascular Diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 2009;16(12):1451-1462
6. Sauerwein W. Neutron Capture Therapy. Principles and Applications. N-Y: Springer, 2012. - 553pp
7. Advances in Boron Neutron Capture Therapy, International atomic energy agency. Non-serial Publications. IAEA: Vienna, 2023. - 416 pp
8. Wang P, Zhen H, Jiang X, et al. Boron neutron capture therapy induces apoptosis of glioma cells through Bcl-2/Bax. *BMC Cancer*. 2010;10:661
9. Kinashi Y, Okumura K, Kubota Y, et al. Dose-rate effect was observed in T98G glioma cells following BNCT. *Appl Radiat Isot*. 2014;88:81-85
10. Coderre JA, Makar MS, Micca PL, et al. Derivations of relative biological effectiveness for the high-LET radiations produced during boron neutron capture irradiations of the 9L rat gliosarcoma in vitro and in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993;27(5):1121-1129
11. Menichetti L, Gaetano L, Zampolli A. In vitro neutron irradiation of glioma and endothelial cultured cells. *Appl Radiat Isot*. 2009;67(7-8 Suppl):336-340
12. Byvaltsev VA, Zavyalov EL, Kanygin VV, et al. Cytopathic effects of boron neutron capture therapy on an accelerator source of epidermal neutrons for human glioblastoma cell culture. *Siberian Journal of Oncology*. 2019;18:4:34-42
13. Kanygin V, Razumov I, Zaboronok A, et al. Dose-dependent suppression of human glioblastoma xenograft growth by accelerator-based boron neutron capture therapy with simultaneous use of two boron-containing compounds. *Biology*. 2021;10:11
14. Krivoshepkin AL, Kanygin VV, Kasatova AI, et al. Evaluation of the effectiveness of boron neutron capture therapy on the heterotopic model of glioblastoma u87 in immunodeficient SCID mice. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021;4:48-56
15. Zavyalov E, Zaboronok A, Kanygin V, et al. 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. *International Journal of Radiation Biology*. 2020;96:7:868-878
16. Kanygin VV, Zavyalov EL, Simonovich AE i dr. Bor-neutron-zakhvatnaya terapiya dlya chelovecheskoy glioblastomy v modelyakh opukholey in vivo. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2019;1:19
17. Seo IH, Lee J, Na D, et al. The Anti-Tumor Effect of Boron Neutron Capture Therapy in Glioblastoma Subcutaneous Xenograft Model Using the Proton Linear Accelerator-Based BNCT System in Korea. *Life (Basel)*. 2022;12(8):1264
18. Haselsberger K, Radner H, Gössler W. Subcellular boron-10 localization in glioblastoma for boron neutron capture therapy with Na²B¹²H¹¹SH. *J Neurosurg*. 1994;81:741-744. <https://doi.org/10.3171/jns.1994.81.5.0741>
19. Clendenen NR, Barth RF, Gordon WA et al. Boron neutron capture therapy of a rat glioma. *Neurosurgery*. 1990;26:47-55
20. Wittig A, Huiskamp R, Moss RL, et al. Biodistribution of ¹⁰B for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in a Mouse Model after Injection of Sodium Mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate and L-para-Boronophenylalanine. *Radiat Res*. 2009;172:493-499
21. Wittig A, Stecher-Rasmussen F, Hilger RA, et al. Sodium mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate (BSH), a boron carrier that merits more attention. *Appl Radiat Isot*. 2011;69(12):1760-1764. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.02.046>
22. Gabel D, Holstein H, Larsson B et al. Quantitative neutron capture radiography for studying the biodistribution of tumor-seeking boron-containing compounds. *Cancer Res*. 1987;47:5451-5454
23. Joel DD, Slatkin DN, Micca PL, et al. Uptake of boron into human gliomas of athymic mice and into syngeneic cerebral gliomas of rats after intra carotid infusion of sulphydryl boranes. In: Fairchild RG, Bond VP, Woodhead AD (eds) *Clinical aspects of neutron capture therapy*. Plenum Press: New York, 1989. - P. 325-332
24. Joel DD, Slatkin DN, Micca PL, et al. Uptake of boron into human gliomas of athymic mice and into syngeneic cerebral gliomas of rats after intracarotid infusion of sulphydryl boranes. *Basic Life Sci*. 1989;50:325-332
25. Joel D, Slatkin D, Fairchild R, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of the TI - sulphydryl boranes (monomer and dimer) in glioma-bearing rats. *Strahlenther Onkol*. 1989;165:167-170
26. Joel D, Slatkin D, Coderre J. Uptake of ¹⁰B in gliosarcoma: following the injection of glutathione monoethyl ester and sulphydryl borane. In: Soloway AH, Barth RF, Carpenter DE (eds). *Advances in neutron capture therapy*. Plenum Press: New York, 1993. - P. 501-504
27. Wittig A, Sauerwein WA, Coderre JA. Mechanisms of transport of p-boronophenylalanine through the cell membrane in vitro. *Radiat Res*. 2000;153:173-180
28. Joel DD, Coderre JA, Micca PL, Nawrocky MM. Effect of dose and infusion time on the delivery of p-boronophenylalanine for neutron capture therapy. *J Neurooncol*. 1999;41:213-221
29. Barth RF, Yang W, Rotaru JH et al. Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival following intracarotid injection of either sodium borocaptate or boronophenylalanine with or without blood-brain barrier disruption. *Cancer Res*. 1997;57:1129-1136
30. Coderre JA, Joel DD, Micca PL et al. Control of intracerebral gliosarcomas in rats by boron neutron capture therapy with p-boronophenylalanine. *Radiat Res*. 1992;129:290-296
31. Joel DD, Fairchild RG, Laissue JA et al. Boron neutron capture therapy of intracerebral rat gliosarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:9808-9812
32. Coderre JA, Button TM, Micca PL et al. Neutron capture therapy of the 9L rat gliosarcoma using the p-boronophenylalanine-fructose complex. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994;30:643-652
33. Saris SC, Solares GR, Wazer DE et al. Boron neutron capture therapy for murine malignant gliomas. *Cancer Res*. 1992;52:4672-4677
34. Matalka KZ, Bailey MQ, Barth RF et al. Boron neutron capture therapy of intracerebral melanoma using boronophenylalanine as a capture agent. *Cancer Res*. 1993;53:3308-3313

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FSUS-2020-0039).

Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования

Financing: The work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project № FSUS-2020-0039).

The authors declare that they have no conflicts of interest in the planning, implementation, financing and use of the results of this study

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Каныгин Владимир Владимирович, кандидат медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник Института ядерной физики имени Г.И. Будкера Сибирского отделения РАН; заведующий лабораторией ядерной и инновационной медицины, доцент кафедры физики элементарных частиц Новосибирского национального исследовательского государственного университета, Новосибирск, Россия; e-mail: kanigin@mail.ru

Колдышева Елена Владимировна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины; старший научный сотрудник лаборатории ядерной и инновационной медицины Новосибирского национального исследовательского государственного университета, Новосибирск, Россия; e-mail: 130066@mail.ru

Завьялов Евгений Леонидович, кандидат биологических наук, заведующий Центром доклинических испытаний SPF-вивария Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН; научный сотрудник лаборатории ядерной и инновационной медицины Новосибирского национального исследовательского государственного университета, Новосибирск, Россия; e-mail: zavjalov@bionet.nsc.ru

Соловьева Ольга Игоревна, младший научный сотрудник Центра доклинических испытаний SPF-вивария Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН; научный сотрудник лаборатории ядерной и инновационной медицины Новосибирского национального исследовательского государственного университета, Новосибирск, Россия; e-mail: solovieva@bionet.nsc.ru

Каныгин Николай Владимирович, студент, лаборант лаборатории ядерной и инновационной медицины Новосибирского национального исследовательского государственного университета, Новосибирск, Россия; e-mail: kanygin_kolya@mail.ru

Капустина Валентина Ильинична, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии важнейших заболеваний Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия; e-mail: kapustina_val@mail.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Vladimir V. Kanygin, Candidate of Medical Sciences, Docent, Senior Researcher of the Budker Institute of Nuclear Physics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Head of the Laboratory of Nuclear and Innovative Medicine and Associate Professor of the Department of Elementary Particle Physics of the Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia; e-mail: kanigin@mail.ru

Elena V. Koldysheva, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Pathological Processes of the Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine; Senior Researcher of the Laboratory of Nuclear and Innovative Medicine of the Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia; e-mail: 130066@mail.ru

Evgeny L. Zav'yalov, Candidate of Biological Sciences, Head of the SPF-Vivarium of the Center for Preclinical Trials of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Researcher of the Laboratory of Nuclear and Innovative Medicine of the Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia; e-mail: zavjalov@bionet.nsc.ru

Ol'ga I. Solov'yova, Junior Researcher of the SPF-Vivarium of the Center for Preclinical Trials of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Researcher of the Laboratory of Nuclear and Innovative Medicine of the Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia; e-mail: solovieva@bionet.nsc.ru

Nikolay V. Kanygin, Student, Laboratory Assistant at the Laboratory of Nuclear and Innovative Medicine of the Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia; e-mail: kanygin_kolya@mail.ru

Valentina I. Kapustina, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of Most Important Diseases Clinical Morphology of the Federal Research Center of the Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia; e-mail: kapustina_val@mail.ru