

АНАЛИЗ НАКОПЛЕНИЯ БОР-НИТРИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В КЛЕТКАХ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ

А. В. Богданова^{1), 2)}, В. К. Кулик¹⁾, С. В. Корень³⁾, Е. Г. Фомина³⁾,
Э. Б. Душанов⁴⁾, А. Н. Бугай⁴⁾, Т. А. Кулагова¹⁾

¹⁾ Научно-исследовательское учреждение «Институт ядерных проблем» Белорусского государственного университета, ул. Бобруйская, 11, 220006, г. Минск, Беларусь, bahdanavanastasya@gmail.com

²⁾ «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

³⁾ Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии, ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Беларусь

⁴⁾ Объединенный институт ядерных исследований, Лаборатория радиационной биологии, ул. Жолио-Кюри, 6, 141980, г. Дубна, Россия

Бор-нитридные наночастицы (БННЧ) являются перспективными агентами для бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ). Исследованы особенности накопления БННЧ в клетках Vero по анализу содержания бора методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой. Методом численного моделирования продемонстрировано, что наибольшая эффективность БНЗТ будет достигнута при накоплении БННЧ в цитоплазме клеток.

Ключевые слова: бор-нейтронозахватная терапия; бор-нитридные наночастицы; клеточная линия Vero; атомно-эмиссионная спектроскопия; численное моделирование.

INSIGHTS INTO THE ACCUMULATION OF BORON NITRIDE NANOPARTICLES IN CELLS FOR EFFECTIVE BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY

A. V. Bahdanava^{1), 2)}, V. K. Kulik¹⁾, S. V. Koran³⁾, E. G. Fomina³⁾,
E. B. Dushanov⁴⁾, A. N. Bugay⁴⁾, T. A. Kulahava¹⁾

¹⁾ Institute for Nuclear Problems of Belarusian State University, Bobruiskaya str., 11, 220006, Minsk, Belarus, bahdanavanastasya@gmail.com

²⁾ International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Dolgobrodskaya str., 23/1, 220070, Minsk, Belarus,

³⁾ Republican Center for Hygiene, Epidemiology, and Public Health, Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology, and Microbiology, Akademicheskaya str., 8, 220012, Minsk, Belarus

⁴⁾ Joint Institute for Nuclear Research, Laboratory of Radiation Biology, Joliot-Curie str., 6, 141980, Dubna, Russia

Boron nitride nanoparticles (BNNPs) are promising agents for boron neutron capture therapy (BNCT). The accumulation features of BNNPs in Vero cells were investigated by analyzing boron content using atomic emission spectroscopy with inductively coupled plasma. Numerical modeling demonstrated that the highest BNCT efficiency would be achieved when BNNPs accumulate in the cytoplasm of cells.

Keywords: boron neutron capture therapy; boron-nitride nanoparticles; Vero cell line; atomic emission spectroscopy; numerical modeling.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2025-1-303-307>

Стандартное лечение злокачественных опухолей включает в себя хирургическое вмешательство для удаления пораженной ткани с последующей химио- и радиотерапией. Исследования в области неинвазивных методов лечения, которые могли бы прийти на смену традиционным протоколам для лечения опухолей, привели к значительному интересу и прогрессу

в области нейтронозахватной терапии (НЗТ). В отличие от традиционной радиотерапии, предполагающей облучение таргетной области высокоэнергетическими рентгеновскими или электронными пучками, НЗТ использует тепловые и эпитепловые нейтроны, которые имеют низкую энергию 0,025–10 кэВ. НЗТ основана на поражающем действии вторичных частиц с высокой линейной передачей энергии и коротким пробегом в биологической ткани, образующихся в результате ядерной реакции захвата нейтронов нуклидами с высоким сечением захвата эпитепловых нейтронов. Одним из таких нуклидов является ^{10}B , который после захвата нейтрона переходит в возбужденный изотоп $^{11}\text{B}^*$ и за пикосекунды распадается на высокоэнергетичные альфа-частицы (^4He), ядра ^7Li и гамма-квант. Впервые терапия, основанная на данном типе реакции, была предложена в середине 1930-х годов и получила название бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ). В 2020 году проведение БНЗТ с L-борфенилаланином (БФА), обогащённым изотопами ^{10}B , в виде его комплекса с D-сорбитом для лечения рака головы и шеи в медицинских учреждениях была одобрена в Японии [1].

Эффективность проведения БНЗТ зависит как от концентрации борсодержащего препарата (и, соответственно, концентрации ^{10}B), его избирательного накопления и распределения именно в опухолевых клетках-мишенях, так и от параметров облучения. Ввиду того, что технология генерации нейтронов с использованием ускорителей уже активно используется в различных странах основной акцент в области БНЗТ на данный момент смещен в сторону разработки новых борсодержащих препаратов и протоколов их стандартизации.

Агенты для БНЗТ должны обладать следующими характеристиками: (1) концентрация ^{10}B в опухолевой ткани должна оставаться постоянной на протяжении всего нейтронного облучения и составлять примерно 10^9 атомов на клетку; (2) селективно накапливаться в опухолевых клетках; (3) обладать низкой системной токсичностью и быстрым выведением из организма после терапии. Традиционные противоопухолевые препараты характеризуются низкой избирательностью накопления и эффективны при концентрациях порядка 10^{-6} – 10^{-9} М на клетку. Для получения достаточного терапевтического эффекта при БНЗТ считается, что требуется примерно 10^{-3} М (10 мкг/мл) бора на клетку, что соответственно значительно увеличивает дозу вводимого препарата для лечения и связанные с этим побочные эффекты на организм [2]. В качестве перспективного борсодержащего препарата для БНЗТ, которые способны значительно повысить эффективность терапии, могут рассматриваться бор-нитридные наночастицы (БННЧ).

БННЧ – нульмерные наноматериалы с графеноподобной структурой, образованной насыщенными шестичленными циклами с атомами бора и азота в вершинах, обладающие малыми размерами, интенсивной люминесценцией и химической стабильностью [3]. Особый интерес к исследованию возможности использования данных наночастиц как агента БНЗТ связан с возможностью значительно понизить концентрацию вводимого препарата из-за большего содержания атомов бора на молекулу по сравнению со всеми известными органическими и неорганическими соединениями бора, а также осуществлять оценку степени накопления препарата оптическими методами. Дискуссионным вопросом в литературе остается оценка взаимодействия БННЧ с различными типами опухолевых клеток, в том числе механизмы накопления наночастиц в клетках, степень биосовместимости и цитотоксичности. Следует также учитывать, что эффект гибели клеток при БНЗТ обусловлен частицами с высокой линейной передачей энергии и радиусом действия, не превышающим диаметр клетки. Поэтому решающими факторами при определении эффективности терапии являются внутриклеточное распределение изотопов бора и морфологические особенности целевых опухолевых клеток.

Цель исследования – определить особенности накопления БННЧ *in vitro* и провести теоретическую оценку БНЗТ по эффективности воздействия конечных продуктов реакции при различной локализации наночастиц в модели унифицированной клетки.

В работе использовали БННЧ, синтезированные гидротермическим методом из борной кислоты и мочевины. Подробно методика синтеза описана в нашей предыдущей работе [4].

Полученные БННЧ являются фотостабильными и обладают максимумом флуоресценции на длине волны 405 нм, при возбуждении на длине волны 320 нм. Соотношение изотопов бора в рассматриваемых наночастицах принимается следующим: ^{10}B с концентрацией 20 ат. % и ^{11}B с концентрацией 80 ат. %.

Исследования накопления БННЧ *in vitro* проводили как в суспензии, так и в монослоях клеток Vero почки мартышки. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % бычьей сыворотки при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 в посевной дозе $0,5 \cdot 10^5$ клеток/мл. После достижения в культуральных флаконах 80% конфлюэнтности монослоя клеток (3-4 день после пассажа) в стерильных условиях проводили добавление БННЧ в концентрации 200 мкг/мл. Через 48 часов с флаконов сливали среду, а клетки снимали с адгезионной поверхности 0,25% раствором трипсин-EDTA и ресуспендировали в HEPES буфере (pH=7,4). При работе с суспензией клеток Vero накопление БННЧ в концентрации 100 и 200 мкг/мл проводили в эпендорфах в среде RPMI в течение 4 часов при 37 °C. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, а клетки ресуспендировали в фосфатном буферном растворе (pH=7,4). Подсчёт количества клеток в образцах осуществляли в камере Горяева. Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) для определения содержания бора во всех полученных образцах была проведена с использованием спектрометра ICPE-9000 (Shimadzu, Япония). Пробоподготовку образцов проводили на приборе Milestone Ethos E (Италия), калибровочные графики были получены с использованием стандартных растворов ГСО. Расчет концентрации бора в анализируемых образцах, а также оценка статистических параметров измерения производилась программным обеспечением «ICPE Solution».

Теоретическая оценка эффективности воздействия конечных продуктов реакции захвата нейтронов при проведении БНЗТ при различной локализации наночастиц в модели унифицированной клетки было осуществлено с помощью программы «Транспорт ионов в веществе» (TRIM) кода «Остановка и диапазон ионов в веществе» (SRIM) [5].

Ранее методом флуоресцентной микроскопии нами было показано, что накопление БННЧ в клетках линии Vero при инкубировании в течение 24 ч в культуральной среде можно зарегистрировать при добавлении БННЧ в концентрациях от 100 мкг/мл и выше [4]. АЭС-ИСП является одним из рекомендуемых количественных методов измерения концентрации бора. В таблице представлены результаты определения концентрации бора в клетках Vero методом АЭС-ИСП после инкубирования с БННЧ. Первое, что стоит отметить, это зарегистрированное нами высокое начальное содержание бора в клетках клеточной линии Vero, что значительно усложнило интерпретацию полученных результатов. Тем не менее, после обработки данных и нормирования полученных концентраций на количество клеток, стало очевидным, что на процесс накопления БННЧ в клетках влияет среда, в которой осуществлялось инкубирование. Так, при добавлении БННЧ в концентрации 200 мкг/мл в культуральную среду с сывороткой и достаточно продолжительном инкубировании (48 ч) удалось добиться повышения концентрации В (и ^{10}B соответственно) в клетках только на 9,5 % по сравнению с контрольными образцами. В то время как при инкубировании наночастиц в той же концентрации в среде RPMI уже за 4 ч достигается увеличение концентрации бора на 19,2 %. Такая низкая интенсивность накопления БННЧ при инкубировании в культуральной среде может быть обусловлена тем, что наночастицы склонны к связыванию с находящимися в ней белками, тем самым понижая активную концентрацию свободных наночастиц в образце. Увеличение концентрации бора в клетках, инкубируемых в среде без белков, может достигаться повышением концентрации БННЧ в среде. Повышение концентрации БННЧ в среде RPMI со 100 до 200 мкг/мл привело к увеличению концентрации бора в клетках почти на 8 %.

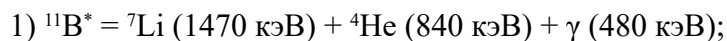
В литературе отсутствует однозначное мнение о концентрации атомов бора и борсодержащих препаратов в пересчете на опухолевую клетку для достижения ее эффективного повреждения при облучении нейтронами. Ввиду приблизительности расчета количества атомов

в структуре БННЧ, сделать однозначный вывод о требуемых концентрациях наночастиц для эффективной БНЗТ на данный момент не представляется возможным. Вероятно, дальнейшие исследования по облучению клеток, накопивших БННЧ помогут найти ответ на этот вопрос.

Накопление бора в клетках Vero

Время накопления/ концентрация БННЧ		Общая с(В) мкг В/ 106 клеток мкг В/ 106 клеток	Δс (В) в клетках	
			%	
4 ч RPMI	Контроль	26±3	-	-
	100 мкг/мл БННЧ	29±2	3	11,5
	200 мкг/мл БННЧ	31±2	5	19,2
48 ч DMEM	Контроль	21±5	-	-
	200 мкг/мл БННЧ	23±4	2	9,5

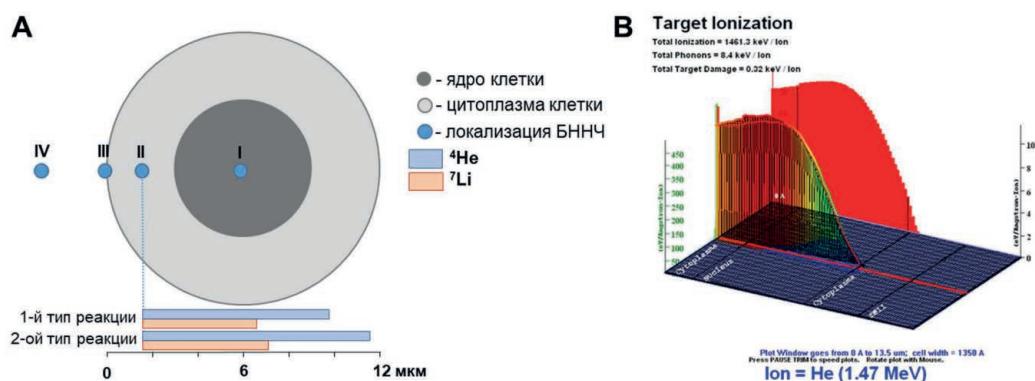
Для оценки влияния локализации и накопления бора в определенных структурных частях клеток на эффективность проведения БНЗТ был промоделирован процесс взаимодействия эффективных ионов (α -частиц и ионов Li) с унифицированной моделью клетки [6] с помощью программного пакета TRIM/SRIM (рисунок). Распределение величин и вкладов энергии ионизации в ткани – два важных параметра, используемых для оценки прямого повреждения опухолевых клеток и побочных эффектов для здоровых клеток при радиотерапии. Было выбрано 4 возможных положения атомов бора в клетке: внутри ядра (I), внутри цитоплазмы (II), на поверхности клеточной мембраны (III), в межклеточном пространстве (IV). При моделировании, ввиду ограничений программного пакета, распространяющиеся в веществе эффективные ионы принимаются образованными в результате распада ядра $^{11}\text{B}^*$ (в возбужденном состоянии) после захвата ядром ^{10}B тепловых нейтронов. Рассматривалось два типа реакций, протекающих при распаде $^{11}\text{B}^*$ (в 94 % случаев распад будет осуществляться по 1 типу):



Результаты моделирования пробегов ионов при различной исходной локализации атомов бора показали, что большая часть ^4He и ^7Li в результате распада $^{11}\text{B}^*$ не выходят за пределы клетки в направлении их распространения. Так, средние значения пробегов ^4He при 1 и 2 типе реакции составили $8,36 \pm 0,21$ мкм и $10,05 \pm 0,11$ мкм, а ^7Li – $5,17 \pm 0,23$ и $5,64 \pm 0,11$ мкм, соответственно. Это подтверждает, что БНЗТ можно рассматривать как внутреннюю направленную лучевую терапию с локальным разрушением опухолевых клеток, при минимальном воздействии на соседние здоровые клетки.

Основной механизм повреждения клетки при воздействии ионизирующего излучения и высокоэнергетических частиц заключается в образовании свободных радикалов, модифицирующих липиды, белки и нуклеиновые кислоты, и прямом повреждении молекул ДНК, приводящем, как правило, к одноцепочечным и двуцепочечным разрывам двойной спирали [7]. Достаточно короткий пробег ^4He и ^7Li вне зависимости от начального положения ^{10}B позволяет локализовать потери энергии ионов непосредственно в пределах модели унифицированной клетки. Создание большого количества разрывов в структуре ДНК в одном регионе, кластерное повреждение с использованием БННЧ может повысить эффективность БНЗТ. Тогда очевидно, что локализация изотопов ^{10}B в клетке, которая будет приводить к максимуму энерго-

выделения в области ядра будет являться наиболее эффективной. Результаты моделирования профилей ионизации при взаимодействии ионов ^4He и ^7Li с веществом клетки показали, что при локализации БННЧ в цитоплазме клеток (II) достигается наибольшее повреждение ядра при обоих типах реакции распада $^{11}\text{B}^*$.



Теоретическое моделирование взаимодействия эффективных ионов (α -частиц и ионов Li) с унифицированной моделью клетки: (А) модель унифицированной клетки, с различной локализацией БННЧ и пробегом ионов для расположенных в цитоплазме наночастиц, (В) программное окно пакета TRIM/SRIM с проекцией ионизации мишени при взаимодействии ^4He (1470 кэВ) с веществом клетки при локализации БННЧ в цитоплазме

Таким образом, в данной работе были определены особенности накопления БННЧ в клетках Vero по исследованию концентрации внутриклеточного бора методом АЭС-ИСП. Среда и время инкубирования, а также исходная концентрация наночастиц значительно влияют на процесс их накопления клетками. Наилучшие результаты были получены при инкубировании клеток с БННЧ в бессывороточной среде в максимальной исследуемой концентрации 200 мкг/мл – концентрация бора в клетках составила 31 мкг / 10^6 клеток. На модели унифицированной клетки методом численного моделирования установлено, что наибольшая эффективность БНЗТ будет достигаться при накоплении БННЧ в цитоплазме клеток. Полученные практические и теоретические результаты показывают, что применение БННЧ, функционализированных для накопления в цитоплазме клеток, является перспективным и позволит сократить дозу вводимого препарата и время облучения при БНЗТ.

Библиографические ссылки

1. Proposal of recommended experimental protocols for in vitro and in vivo evaluation methods of boron agents for neutron capture therapy / Y. Hattori [et al.] // J Radiat Res. 2023. Vol. 64, iss. 6. P. 859–869.
2. Designation products: boron neutron capture therapy for head and neck carcinoma / H. Kanno [et al.] // Oncologist. 2021. Vol. 26. e1250–e5.
3. Hexagonal boron nitride quantum dots: Properties, preparation and applications / X. Zhang [et al.] // Mater. Today Chem. 2021. Vol. 20. P. 1–17.
4. Богданова А. В. и др. Синтез и внутриклеточная визуализация бор-нитридных наночастиц // Сахаровские чтения 2024 года: экологические проблемы XXI века: материалы 24-й международной научной конференции, Минск, 23–24 мая 2024 г.: в 2 ч. / Междунар. гос. экол. ин-т им. А. Д. Сахарова Бел. гос. ун-та; редкол.: А. Н. Батын [и др.]. Минск, 2024. Ч. 1. С.364 – 367.
5. Ziegler J. James Ziegler - SRIM & TRIM [Electronic resource]. 2017. URL: <http://www.srim.org/>.
6. Calculation of the radiation damage to a tumor cell based on an improved cell model in boron neutron capture therapy / D. Liu [et al.] // New Phys. Sae Mulli. 2017. Vol. 67, iss. 2. P. 248–255.
7. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection / J. A. Reisz [et al.] // Antioxid Redox Signal. 2014. Vol. 21, iss. 2. P. 260–292.