

УДК 66-936.5

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЭЛЕМЕНТНОГО БОРА МЕТОДОМ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ОБРАБОТКИ В ВОДНОЙ СРЕДЕ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ

© 2020 г. С. А. Успенский^{1,2}, П. А. Хаптаханова^{1,2,*}, А. А. Заборонок^{3,4}, Т. С. Куркин¹, О. Ю. Волкова⁵, Л. В. Мечетина⁵, А. Н. Таранин⁵, В. В. Каныгин⁴, А. Мацумура³, С. Ю. Таскаев⁶

Представлено академиком РАН А.М. Музафаровым

Поступило 05.03.2020 г.

После доработки 03.04.2020 г.

Принято к публикации 05.04.2020 г.

Описан метод получения наночастиц элементного бора размером меньше 100 нм с применением ультразвукового диспергирования в жидкой среде и последующего каскадного фракционирования. Полученные наночастицы бора были применены в качестве мишенного агента для бор-нейтронозахватной терапии. По результатам экспериментального доклинического исследования бор-нейтронозахватной терапии с применением синтезированных наночастиц бора было установлено, что облучение потоком нейтронов в течение 1 ч клеток глиомы человека Т98G, предварительно инкубированных в среде с наночастицами бора (10, 20, 40 м.д. в пересчете на изотоп бор-10), ведет к значительному подавлению их жизнеспособности.

Ключевые слова: элементный бор, наночастицы бора, ультразвуковое диспергирование, кавитация, глиома, цитотоксичность, бор-нейтронозахватная терапия, ускоритель эпитепловых нейтронов

DOI: 10.31857/S2686953520020119

Одной из прикладных задач в терапии рака является разработка новых препаратов для повышения эффективности лечения онкологических заболеваний. Частицы элементного бора – потенциально новая форма мишенного препарата для противораковой методики бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ), благодаря высокому содержанию атомов бора в одной частице. БНЗТ – это бинарный радиотерапевтический метод, осно-

ванный на реакциях захвата и деления ядер при облучении стабильного нерадиоактивного изотопа бора-10 тепловыми нейтронами с образованием высокоэнергетичных альфа-частиц и ядер лития [1–4]. Селективное накопление препарата на основе бора-10 в необходимой терапевтической концентрации (10 млрд атомов бора-10 на 1 клетку) внутри пораженной области и последующее облучение нейтронами приводят к направленному разрушению заданной области благодаря выделению энергии ядерной реакции в пределах одной клетки [4].

В данной работе впервые методом ультразвукового диспергирования в жидкой среде и последующего каскадного фракционирования получены наночастицы элементного бора размером менее 100 нм. Впервые проведена оценка возможности использования полученных таким способом наночастиц бора в качестве мишенного агента нового типа для БНЗТ, который характеризуется отсутствием токсичности и обеспечивает достаточное накопление бора-10 в исследуемой клеточной линии. Исследована жизнеспособность борсодержашей и интактной опухолевой клеточной линии глиомы человека Т98G после облучения эпитепловыми нейтронами на ускорительном источнике в Институте ядерной физики СО РАН (г. Новосибирск). Впервые показано, что облуче-

¹ Институт синтетических полимерных материалов Российской академии наук (ИСПМ РАН), Москва, Россия

² Московский физико-технический институт (МФТИ), г. Долгопрудный, МО, Россия

³ Университет Цукубы, г. Цукуба, 1-1-1 Теннодай, 3058-8575 Япония

⁴ Новосибирский государственный университет (НГУ), Новосибирск, Россия

⁵ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

⁶ Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук (ИЯФ СО РАН), г. Новосибирск, Россия

*E-mail: khaptakhanova@ispm.ru

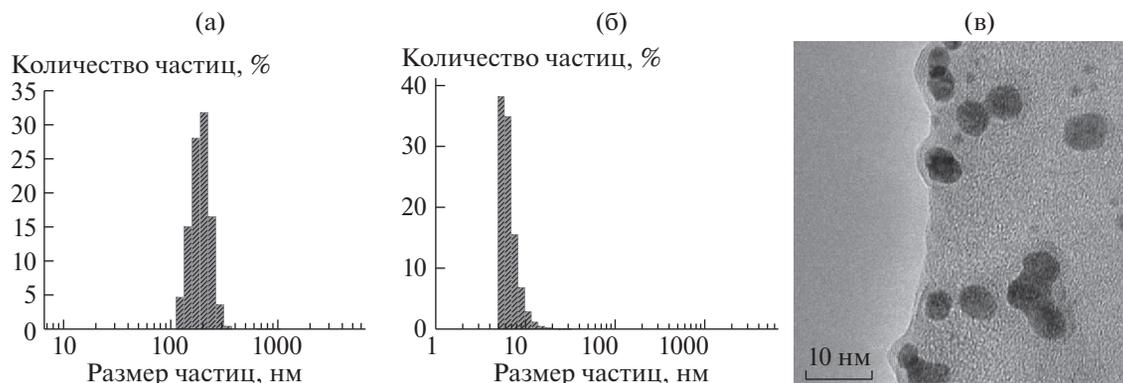


Рис. 1. Распределение частиц бора по размерам после первой (а), и третьей (б) стадии УЗ-обработки. Микрофотография частиц бора после третьей стадии УЗ-обработки (в).

ние опухолевых клеток линии Т98G, культивируемых в ростовых средах в присутствии наночастиц элементного бора в концентрации 10, 20 и 40 м.д. в пересчете на изотоп бор-10, уменьшает ее колониеобразующую способность по сравнению с контролем (содержание наночастиц бора 0 м.д.).

В технологической практике получение частиц элементного бора в основном осуществляют методами химического осаждения из газовой фазы (ХОГФ) [5]. Следует отметить, что методы ХОГФ позволяют получать порошки элементного бора, в гранулометрическом составе которых преобладают частицы с широким распределением по размерам (от 0.5 до 20 мкм). Подобные материалы оказываются неприменимы в качестве мишеней для БЗНТ, поскольку соответствующие борсодержащие препараты для доклинических исследований применяются в виде растворов или коллоидных систем [6] с размером дисперсной фазы не более 100 нм.

В настоящей работе показано, что современные ультразвуковые технологии могут быть успешно применены для усовершенствования технологичных методов ХОГФ. Установлено, что ультразвуковая обработка позволяет диспергировать частицы спекшегося порошка бора до размеров нанометрового диапазона. При этом использование воды в качестве дисперсионной среды является одним из главных преимуществ при последующем изготовлении препаратов БНЗТ для доклинических исследований.

Получение наночастиц элементного бора проводили по следующей схеме [7]: в стеклянный стакан помещали 0.1 г мелкодисперсного порошка элементного бора (аморфный бор, марка Б99В, производитель AVIOBOR: массовая доля бора не менее 99%, средний размер дисперсии частиц 0.5–4 мкм) и добавляли 25.0 мл бидистиллированной воды. При продолжительном воздействии ультразвуком (УЗ) ($\tau_1 = 360$ мин) на исходную микронную дисперсию бора, а также каскадного

фракционирования, была получена фракция частиц 100–250 нм – стадия I (рис. 1а). При дальнейшем воздействии УЗ на фракцию частиц в интервале размеров 100–250 нм ($\tau_{II} = 160$ мин), были получены наноразмерные частицы бора в интервале 50–70 нм – стадия II. Воздействие ультразвука на фракцию 50–70 нм в течение $\tau_{III} = 180$ мин приводит к образованию нанодисперсии 5–15 нм – стадия III-А. При диспергировании фракции 50–70 нм в течение $\tau_{III} = 250$ мин образуется дисперсия сферических наночастиц в интервале размеров 5–10 нм – стадия III-В (рис. 1б, 1в).

Процесс диспергирования проводили при помощи ультразвукового генератора (“Инлаб”, Россия) с погружным зондом из титанового сплава, с выходной мощностью 0.63 кВт. На каждой стадии процесса дробления распределение частиц по размерам в гидрозольях бора определяли методом динамического светорассеяния на анализаторе Zetatrac (Microtrac, США). Исследования размера и формы частиц на конечной стадии ультразвукового диспергирования проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi H-800, Япония ($\times 40000$).

Структуру наночастиц бора исследовали методом рентгеновской дифракции с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (Германия), CuK α -излучение ($\lambda = 1.5418$ нм), Ni-фильтр, фокусирующий Ge-монокроматор, детектор LYNXEY. Измерения проводили в режиме съемки “на просвет” в диапазоне углов рассеяния $2\theta = 10^\circ - 50^\circ$, с вращением образца со скоростью 90 об./мин. Перед проведением рентгенографических измерений образцы гидрозольей бора замораживались в жидком азоте и высушивались с помощью лиофильной сушки Alpha 2-4 LSC (Martin Christ, Германия) для получения высокодисперсного порошка, навеска которого помещалась между слоями пленки аморфного полиэтилентерефталата. Обработку рентгенограмм (нормировку, учет некогерентного и фонового

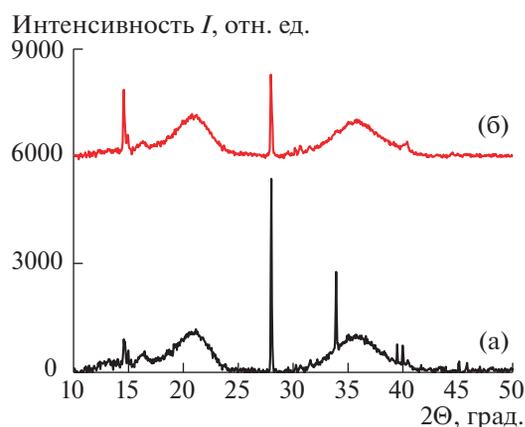


Рис. 2. Рентгенограммы порошков бора до УЗ-обработки (а) и после третьей стадии УЗ-обработки (б).

рассеяния) проводили с помощью программ DIFFRAC EVA и Origin 15 Pro.

На рис. 2 представлены дифрактограммы порошков бора до УЗ-обработки (рис. 2а) и после третьей стадии (рис. 2б). Представленные данные свидетельствуют о том, что в структуре частиц элементный бор находится в аморфном состоянии (галло на $2\theta = 17^\circ\text{--}24^\circ$ и $30^\circ\text{--}42^\circ$), как до УЗ-обработки, так и после трех ее стадий. Наряду с аморфным элементарным бором в структуре частиц наблюдаются примеси поликристаллической борной кислоты. В исходном порошке примеси борной кислоты имеют кристаллическую решетку триклинной сингонии с рефлексами 010 ($2\theta = 14.60^\circ$), 100 ($2\theta = 14.98^\circ$) и 002 ($2\theta = 28.02^\circ$). УЗ-обработка, предположительно, приводит к частичному растворению борной кислоты в процессе кавитационного дробления частиц, и ее повторной кристаллизации при высушивании гидрозольа после трех стадий УЗ-обработки с образованием гексагональной решетки (рефлексы 100 ($2\theta = 14.50^\circ$), 003 ($2\theta = 27.97^\circ$) и 201 ($2\theta = 30.72^\circ$)).

Представленные результаты свидетельствуют о том, что многостадийная УЗ-обработка является эффективным и легко масштабируемым способом получения наночастиц элементного бора.

Поскольку основное действие наночастиц бора направлено на терапию рака при облучении нейтронами, были проведены следующие биологические тесты: определение цитотоксичности наночастиц бора, накопление бора в онкоклетках и оценка эффективности БНЗТ при помощи клоногенного анализа.

Модельные эксперименты были выполнены на опухолевой клеточной линии глиомы человека Т98G, часто используемой в исследованиях действия ионизирующего излучения, в том числе нейтронного [8]. Клетки глиомы человека Т98G

были предоставлены Институтом цитологии Российской академии наук (г. Санкт-Петербург), культивировались в среде Iscove's DMEM (IMDM, SIGMA 17633 с L-глутамином и 25 мМ HEPES буфером) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Scientific HyClone SV30160.03 HyClone UK Ltd.) при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO_2 .

Цитотоксичность препарата на основе наночастиц бора определялась с помощью колориметрического теста Cell Titer 96 AQueous One Solution (Корпорация Promega, Мэдисон). 4×10^4 клеток Т98G помещали в каждую лунку 96-луночного планшета в 100 мкл среды и инкубировали в течение 24 ч. Среду заменяли средой с наночастицами бора (размер частиц 5–10 нм) в концентрациях 0–250 мкг бора/мл и далее инкубировали в течение 24 ч. Затем среду удаляли и клетки промывали буферным раствором. 2 мл раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2Н-тетразолия (MTS) с PMS (Cell Titer 96 AQueous One Solution) смешивали с 10 мл среды и добавляли в количестве 100 мкл в каждую лунку. Планшеты инкубировали в течение 2 ч и затем помещали в оптический анализатор Multiscan FC (ThermoFisher Scientific, США) и измеряли оптическую плотность при длине волны 490 нм. Данные представлены как доля выживших клеток, инкубированных с препаратом, относительно клеток, инкубированных без препарата (табл. 1).

Данные цитотоксичности показали низкую токсичность наночастиц в диапазоне концентраций бора до 250 м.д. (мкг/мл раствора среды) — бор-10:50 м.д., который в разы перекрывает требуемый терапевтический диапазон (~20 м.д.), что подтвердило пригодность наночастиц для дальнейших экспериментов по нейтронному облучению.

Таблица 1. Оценка цитотоксичности наночастиц бора для клеточной линии Т98G; эффективность колониеобразующей способности клеточной линии Т98G в присутствии наночастиц (НЧ) бора после нейтронного облучения; оценка накопления наночастиц бора в клетках Т98G

№	Концентрация наночастиц бора, мкг/мл среды	Эффективность колониеобразования Т98G, инкубированная с НЧ бора, после нейтронного облучения, %	Оценка цитотоксичности Т98G, инкубированная с НЧ бора, %	Оценка накопления наночастиц бора в Т98G, методом ИСП-АЭС, мкг/мл среды
1	0	100.0	100.0	0.0
2	50 (бор-10:10 м.д.)	84.5	92.0	48.5
3	100 (бор-10:20 м.д.)	52.0	88.0	98.6
4	150 (бор-10:30 м.д.)	40.0	86.0	145.0
5	200 (бор-10:40 м.д.)	29.0	84.0	197.5
6	250 (бор-10:50 м.д.)	23.0	85.0	246.0

Количественный анализ содержания бора в клетках Т98G проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии в индуктивно-связанной плазме (ИСП-АЭС) на приборе iCAP 6500 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, США) [2]. Инкубацию клеток с наночастицами бора (размер частиц 5–10 нм) проводили в ростовой среде в течение 24 ч. После инкубации клетки промывали забуференным физиологическим раствором (PBS), снимали с пластиковой подложки 0.05% раствором трипсина (Trypsin-EDTA, Nacalai Tesque, Inc.). Затем образцы с наночастицами бора кипятили в 70%-ной азотной кислоте в течение 3 ч до образования борной кислоты, которую детектировали на приборе. Для калибровки прибора использовали стандартные растворы борной кислоты с известными концентрациями (Boron Standard for ICP, TraceCERT, 1000 мг Н₃ВО₃/л Н₂О, Sigma) (табл. 1).

Наночастицы бора накапливаются в клетках глиомы Т98G в значительном количестве при экспозиции в среде с концентрацией бора-10 40 мкг/мл до 3.9 мкг/10⁶ клеток, что существенно превышает значения накопления борфенилаланина: ВРА (бор-10), 0.37 мкг/10⁶ клеток.

Экспериментальное доклиническое исследование синтезированных наночастиц бора, приближенное к реальным клиническим условиям, было проведено на ускорительном источнике эпитепловых нейтронов [9] в Институте Ядерной Физики СО РАН (г. Новосибирск). Параметры облучения: ток протонного пучка для нейтроногенерирующей мишени 1.8 мА; энергия 2.0 МэВ; флюенс нейтронов 7.2×10^{11} см⁻². С помощью клоногенного анализа установлено, что облучение нейтронами предварительно инкубированных в среде с наночастицами бора (10, 20, 40 м.д. в пересчете на бор-10) опухолевых клеток в течение 1 ч, ведет к значительному подавлению их жизнеспособности (табл. 1).

Результаты исследований в данной работе в дальнейшем могут быть использованы для производства терапевтических препаратов для БНЗТ на основе стабильного изотопа бора-10.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность член-корреспонденту РАН А.Н. Озерину за активное обсуждение результатов данной работы.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-72-30005) и программы фундаментальных научных исследований (проект № 0310-2019-0004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Neutron Capture Therapy*. Principles and Applications. W. A.G. Sauerwein, A. Wittig, R. Moss, Y. Nakagawa, Eds. Springer-Verlag, Heidelberg, 2012.
2. *Ali F., Hosmane N.S., Zhu Y.* // *Molecules* J. 2020. V. 25. P. 828.
3. *Zaboronok A., Yamamoto T., Nakai K., et al.* // *Applied Radiation and Isotopes*. J. 2015. V. 106. P. 181–184.
4. *Barth R.F., Mi P., Yang W.* *Cancer Commun. (Lond)*. 2018. V. 38. № 1. P. 35.
5. *Hutchinson M., Widom M.* // *Computer Physics Commun.* 2012. V. 183. № 7. P. 1422–1436.
6. *Nakamura H., El-Zaria M.E., Ban H.S.* // *Chem. Eur. J.* 2010. V. 16. № 5. P. 1543–1552.
7. *Успенский С.А., Хантаханова П.А., Заборонок А.А., Куркин Т.С. и др.* // RU Patent № 2019117707 (решение о выдаче 30.01.2020), 2020 г.
8. *Yoshida F., Matsumura A., Shibata Y., et al.* // *Cancer Lett. J.* 2002. V. 187. № 1–2. P. 135–141.
9. *Таскаев С.Ю.* // *Физика элементарных частиц и атомного ядра*. 2019. Т. 50. № 5. С. 657–669.

PRODUCING NANOPARTICLES OF ELEMENTAL BORON BY ULTRASONIC TREATMENT IN AN AQUEOUS MEDIUM AND THEIR USE IN BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY

**S. A. Uspenskii^{a,b}, P. A. Khaptakhanova^{a,b,#}, A. A. Zaboronok^{c,d}, T. S. Kurkin^a, O. Yu. Volkova^e,
L. V. Mechetina^e, A. V. Taranin^e, V. V. Kanygin^d, Matsumura Akira^c, and S. Yu. Taskaev^f**

^a *Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials Russian Academy of Sciences (ISPM RAS), Moscow, Russian Federation*

^b *Moscow Institute of Physics and Technology (MIPT), Dolgoprudny, Moscow region, Russian Federation*

^c *University of Tsukuba, Ibaraki 1-1-1, Tsukuba, Tennodai, 305-8575 Japan*

^d *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation*

^e *Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (IMCB SB RAS),
Novosibirsk, Russian Federation*

^f *Budker Institute of Nuclear Physics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

[#] *E-mail: khaptakhanova@ispm.ru*

Presented by Academician of the RAS A.M. Muzafarov

A method for producing elemental boron nanoparticles with a size of less than 100 nm using ultrasonic dispersion in a liquid medium and subsequent cascade fractionation is described. The resulting boron nanoparticles were used as a target agent for boron neutron capture therapy (BNCT). According to the results of an experimental preclinical study of BNCT using synthesized boron nanoparticles, close to the real clinical conditions, it was found that irradiation with a neutron flux for 1 hour of T98G human glioma cells previously incubated in a medium with boron nanoparticles (10, 20, 40 ppm in terms of on boron-10 isotope), leads to a significant suppression of their viability.

Keywords: elemental boron, boron nanoparticles, ultrasonic dispersion, cavitation, glioma, cytotoxicity, boron neutron capture therapy, epithermal neutron accelerator