

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДЕЙСТВИЯ НЕЙТРОННОГО И ПРОТОННОГО ИЗЛУЧЕНИЙ НА ОПУХОЛЕВЫЙ ОТВЕТ СОЛИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА И РЕАКЦИИ КОЖИ У МЫШЕЙ В РАННИЕ И ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ

© 2022 г. О.М. Розанова*, #, Е.Н. Смирнова*, Т.А. Белякова**, ##, Н.С. Стрельникова**, А.Е. Шемяков*, **, А.В. Смирнов**

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: rozanova.iteb@gmail.com

**Физико-технический центр Физического института им. П.Н. Лебедева,
Академический пр., 2/110, Протвино, Московская область, 142281, Россия

##E-mail: belyakovata@lebedev.ru

Поступила в редакцию 15.07.2022 г.

После доработки 15.07.2022 г.

Принята к публикации 22.07.2022 г.

Изучено влияние последовательности действия протонного излучения в суммарной дозе 80 Гр и нейтронного в дозе 5 Гр при сочетанном облучении солидной формы асцитной карциномы Эрлиха на опухолевый ответ и лучевые реакции кожи у мышей-опухоленосителей в ранние и отдаленные сроки. Обнаружено, что облучение мышей нейтронами как до, так и после облучения протонами эффективно подавляло рост солидной асцитной карциномы Эрлиха в течение месяца после воздействия. По частоте и тяжести лучевых поражений кожи, наблюдаемых у мышей через 15–40 суток после терапии, облучение нейтронами после облучения протонами приводило к значительному улучшению этих показателей по сравнению с действием только пучка протонов, однако облучение нейтронами до протонов оказалось более повреждающим, чем в других вариантах. Показано также, что частота рецидивирования опухолей в группах животных при комбинированном облучении значительно выше, а общая продолжительность жизни ниже по сравнению с группой мышей, облученных только протонным излучением.

Ключевые слова: нейтроны, протоны, асцитная карцинома Эрлиха, лучевые реакции кожи, рецидивы, мыши.

DOI: 10.31857/S0006302922050180, EDN: JKСJQG

В последнее десятилетие во всем мире интенсивно развиваются центры лучевой терапии, оснащенные установками для протонной терапии опухолей, которая является перспективным методом лечения многих видов онкологических заболеваний. Протонная терапия особенно подходит в тех случаях, когда альтернативные методы терапии не обеспечивают адекватного терапевтического эффекта, а традиционная лучевая терапия представляет высокий риск для пациента. На сегодняшний день более 250 тыс. пациентов получили протонную терапию, которая с успехом применяется для лечения как наиболее распро-

страненных, так и редких видов онкологических заболеваний; применение протонной терапии оказалось особенно эффективным при терапии опухолей головного мозга и в педиатрии [1, 2]. В протонной терапии используется основное преимущество протонов, а именно специфическое распределение поглощенной дозы: относительно низкая энергия частиц на входе в биологическую ткань; наличие пика Брэгга, т.е. максимального энерговыделения в конце пробега частицы на заранее заданной глубине непосредственно в опухоли; резкое падение энергии до нуля после пика, которое позволяет не повреждать окружающие здоровые ткани [3]. В медицинских центрах применяют два основных способа формирования дозовых полей для равномерного облучения всего объема мишени при протонной терапии опухолей: метод пассивного рассеяния и метод скани-

Сокращения: ОБЭ – относительная биологическая эффективность, ОСК – опухолевые стволовые клетки, ЛПЭ – линейная потеря энергии, ТСПП – тонкий сканирующий пучок протонов, АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха, СПЖ – средняя продолжительность жизни.

рования карандашным пучком, при которых формируется модифицированная кривая Брэгга. Технология сканирования карандашным пучком позволяет проводить максимально эффективную протонную терапию с модулированной интенсивностью, за счет снижения дозовой нагрузки на здоровые ткани, чего трудно достичь при пассивном рассеянии; кроме того, не требует подготовки специальных компенсаторов и коллиматоров для конкретного пациента, что сокращает сроки и стоимость лечения [4].

Известно, что коэффициент относительной биологической эффективности (ОБЭ) для протонов, характеризующий степень воздействия излучения на биологические структуры относительно гамма- или рентгеновского излучения, не высок, и согласно рекомендациям Международной комиссии по радиационным единицам составляет 1.1 при расчете доз протонной терапии в клинических условиях [5–7]. Для дальнейшего расширения и совершенствования протонной терапии в последние годы были разработаны подходы и методики с целью усиления эффекта протонного излучения с использованием FLASH-терапии [8], нанозансеров [9], схем гипофракционирования [10, 11], а также в сочетании с другими видами облучения и гипертермией [12]. Эти направления в исследованиях обусловлены не только стремлением увеличить ОБЭ протонов и, следовательно, эффективность лучевой терапии, но и сменой научных парадигм о происхождении и развитии онкологических заболеваний, а также о причинах возникновения их рецидивов [13]. В последние годы сформировалось представление о сложном клеточном строении злокачественных образований и присутствия в них опухолевых стволовых клеток (ОСК), которые обладают способностью не только формировать опухоль и поддерживать ее рост, но и имеют более высокую резистентность к действию редкоизионизирующих излучений по сравнению с другими клетками опухоли [14]. Многие факты также указывают на то, что именно ОСК отвечают не только за радиорезистентность таких агрессивных опухолей головного мозга как мультиформная глиобластома, но и за возникновение рецидивов после радиотерапии других видов онкологических заболеваний [9]. Показано, что излучения с высокими значениями линейной потери энергии (ЛПЭ), так называемые плотноионизирующие, к которым относятся протоны, ионы углерода и нейтроны, способны преодолеть радиорезистентность ОСК за счет индукции в них нерепарируемых повреждений ДНК [15, 16], что делает лечение злокачественных новообразований эффективным не только за счет подавления роста опухоли, но и снижения частоты рецидивирования. Также установлено, что облучение протонами с энергией 3 МэВ в дозах, эквивалентных дозам гамма-излучения, более эф-

фективно снижало популяцию ОСК-подобных клеток карциномы легкого, а экспрессия генов, участвующих в гибели клеток, возрастала в десять раз [17].

В ряде исследований показана высокая эффективность нейтронов при лечении радиорезистентных и достаточно распространенных опухолей молочной железы, легкого, гортани, метастазов плоскоклеточного рака, опухолей слюнных желез, различных видов сарком [18, 19]. Особенностью биологического действия нейтронов является практически полное отсутствие зависимости развития повреждающего эффекта от насыщения клеток кислородом и фаз клеточного цикла, а также индуцирование нерепарируемых двунитевых разрывов ДНК, приводящих к гибели опухолевых клеток, в том числе и ОСК, в отличие от действия гамма-излучения [20, 21]. В исследованиях на культурах клеток и на различных видах животных установлено, что в зависимости от энергии частиц, дозы и радиочувствительности объекта ОБЭ нейтронов находится в диапазоне 1.2–8.0 [22]. Исследования клеточной активности клеток мышины меланомы В-16 показали, что предварительное нейтронное облучение может усиливать действие фотонного облучения как аддитивно, так и синергетически, причем эффект зависит от соотношения дозы нейтронов и суммарной дозы [23]. Обнаружено, что одновременное воздействие нейтронов с энергией 14 МэВ и γ -излучения приводит к синергетическому биологическому действию при вкладе нейтронов в суммарную поглощенную дозу 15% или максимум 30% и его снижению до аддитивного при вкладе нейтронов 45%. В экспериментах на мышах с использованием 30-суточной выживаемости ОБЭ импульсного и непрерывного γ -нейтронного излучения была определена в пределах 1.9–3.0 и зависела от режима воздействия и расстояния между активными зонами реактора и платформы с мышами [24]. Современные тенденции использования быстрых нейтронов в лучевой терапии заключаются в замене их самостоятельного применения на схемы сочетанного гамма-нейтронного воздействия, в которых вклад нейтронов в суммарную очаговую дозу колеблется от 20 до 40% [25].

В предыдущих исследованиях нами при экстремальном гипофракционированном облучении тонким сканирующим пучком протонов (ТСПП) солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) в дозах 30+30 Гр [10] и 40+40 Гр [11] была показана эффективность воздействия на рост первичных опухолей, продолжительность периода ремиссии, частоту рецидивов и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышей [26]. С учетом полученных результатов было высказано предположение, что появление вторичных опухолей происходит за счет сохранения единичных

наиболее радиоустойчивых опухолевых клеток, скорее всего ОСК. Поскольку имеются существенные доказательства, свидетельствующие о вкладе ОСК в формирование вторичных солидных злокачественных новообразований на более поздних сроках в месте расположения первичной опухоли, а также в других местах [27], то для повышения эффективности протонной терапии необходимо усилить воздействия на ОСК и снизить частоту рецидивирования.

Целью настоящей работы было исследование влияния последовательности действия протонного излучения в суммарной дозе 80 Гр и нейтронного в дозе 5 Гр при сочетанном облучении солидной формы АКЭ на опухолевый ответ и лучевые реакции кожи у мышей-опухоленосителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах-самцах линии SHK в возрасте 8–9 недель массой 24–28 г. Мыши содержались в виварии ИТЭБ РАН в стандартных условиях и имели свободный доступ к сухому корму и воде [28]. Мышей контрольной и опытных групп содержали в одинаковых условиях на протяжении всего эксперимента. Было использовано 120 мышей, по 15–30 особей в каждой группе.

В качестве модели опухоли была выбрана солидная форма АКЭ [29]. Линия опухолевых клеток получена в РНЦ им. Н.Н. Блохина (Москва, Россия). Клетки АКЭ поддерживали *in vivo* в форме асцита у мышей SHK путем серийной внутрибрюшинной инокуляции с интервалом 7–9 суток. У животных в асептических условиях извлекали асцитную жидкость и трижды промывали фосфатно-солевым буфером с помощью центрифугирования при 500 об/мин в течение 5 мин. Клетки АКЭ после центрифугирования тестировали на жизнеспособность с помощью красителя трипанового синего. Количество клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева и суспендировали в физиологическом растворе в конечной концентрации $20 \cdot 10^6$ клеток/мл. Для индукции солидной АКЭ мышам внутримышечно вводили $2 \cdot 10^6$ клеток в бедро левой задней лапы. При такой имплантации опухолевых клеток частота индукции АКЭ у мышей через 5 суток составляла 100%, и животные гибли через 47 ± 5 суток.

Первое локальное облучение опухолей у мышей пучком протонов в пике Брэгга или нейтронами проводили на пятые сутки после инокуляции АКЭ, когда опухолевый узел пальпировался у всех животных. Перед каждым облучением мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией селективных препаратов ксилазина (Interchemie, Нидерланды) в дозировке 0.7 мг/кг и золетила 100 (Virbac, Франция) – 3.4 мг/кг.

В эксперименте использовалось сочетанное с нейтронами гипофракционированное облучение опухолей тонким сканирующим пучком протонов двумя фракциями по 40 Гр с интервалом 24 ч. Данный режим протонного облучения был выбран на основе наших предыдущих результатов [11], где была показана полная регрессия первичных опухолевых узлов у всех мышей, двукратное снижение частоты рецидивов и увеличение средней продолжительности жизни на 35% у мышей с облученной АКЭ, по схеме 40 + 40 Гр, в отличие от фракционированного облучения в дозах 30 + 30 Гр. Доза облучения нейтронами 5 Гр была выбрана с учетом величины ОБЭ непрерывных нейтронов с энергией 14 МэВ, равной 2.4–2.6, которая была определена на клетках мышинной меланомы В-16 [30] и расчета доли нейтронов в суммарной дозе облучения около 15% для получения синергетического или аддитивного эффекта.

Опухоль у мышей в первой группе облучали только двумя фракциями ТСПП («протоны»), во второй группе предварительно за 3 ч до первой фракции ТСПП мышей с АКЭ облучали нейтронами в дозе 5 Гр («нейтроны+протоны»), третью группу облучали нейтронами в дозе 5 Гр через 3 ч после второй фракции ТСПП («протоны+нейтроны»), а в четвертой группе опухоль однократно облучали нейтронами в дозе 5 Гр («нейтроны»). Пятая (контрольная) группа включала необлученных мышей с опухолями, подвергавшихся транспортировке к источникам излучений, анестезии и имитации условий облучения.

В качестве источника протонного излучения использовали комплекс протонной терапии «Прометеус» (Физико-технический центр ФИАН, Протвино, Московская обл.) [31]. Перед облучением мышь фиксировали пластиковыми зажимами на платформе из полипропилена таким образом, чтобы облучаемая конечность была максимально удалена от тела. Платформу наклонно погружали в водный фантом и получали томограмму с помощью компьютерного томографа с коническим пучком, интегрированного в ускоритель. Для каждой мыши был определен размер опухоли и рассчитан средний фактический объем облучения, который равнялся 0.47 см^3 . Этот объем был выбран на основе наших предыдущих работ, где была показана более высокая противоопухолевая эффективность и значительное увеличение СПЖ мышей при облучении ТСПП именно пальпируемого объема ткани по сравнению с облучением большего по классификации МКРЭ-62, так называемого планируемого объема [10, 26, 32].

Расчет дозы в заданном объеме проводили в программе планирования облучения, основанной на методе Монте-Карло с итеративной динамической оптимизацией по соотношению

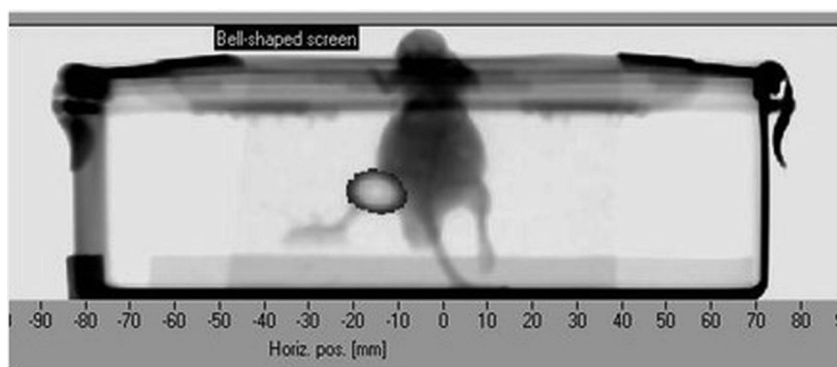


Рис. 1. Положение мыши в водном фантоме во время облучения тонким сканирующим пучком протонов.

min/макс дозы, которая позволяет получить равномерное распределение дозы. Верификацию положения каждой мыши при облучении производили с помощью лазерной системы позиционирования и съемки проекций с совмещением текущего положения мишени с исходным с точностью 1 мм (рис. 1). Облучение заданного объема проводили с двух полей ТСПП, энергия протонов на выходе с направления 0° оставляла 98–104 МэВ, с направления 180° – 96–100 МэВ, сигма пучка на входе в водный фантом составляла 2.8–3.6 мм. Среднее значение ЛПЭ, рассчитанное по программе планирования, в модифицированном пике было равно 2.5 ± 0.5 кэВ/мкм. Облучение проходило в импульсном режиме с длительностью импульса 200 мс и цикличностью 1 импульс в 2 с. Контрольное облучение водного фантома осуществляли с установленными в нем дозиметрами. Дозиметрию протонного облучения проводили с помощью алмазного детектора (ИФТП, Россия) и пленки радиационного контроля Gafchromic EBT2 (США). Погрешность определения поглощенной дозы протонов составила около 5%.

Источником нейтронов служил портативный нейтронный генератор непрерывного действия НГ-14 (МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал НМИРЦ Минздрава России, Обнинск, Калужская обл.). Принцип работы генератора заключается в ускорении до энергии 100–300 кэВ ионов дейтерия на тритиевую мишень. В результате реакции ${}^3\text{H}(d,n){}^4\text{He}$ образуются нейтроны с энергией ~ 14 МэВ и потоком нейтронов $\sim 10^{10}$ н/с [33]. Мышей, разделенных на подгруппы по пять животных в каждой, облучали нейтронами на полиметилметакрилатной платформе. Для локального облучения АКЭ левые задние лапы мышей фиксировали в центре платформы на расстоянии 5–6 см от мишени генератора таким образом, чтобы бедро мыши находилось в поле облучения (рис. 2). Технические параметры установки не позволяли проводить локальное облучение толь-

ко пальпируемого объема опухоли, поэтому была облучена вся левая лапа с опухолью. Мощность дозы нейтронов на выходе составила $41 \cdot 10^{-4}$ Гр/с. Мониторинг непрерывного потока нейтронов осуществлялся с помощью «Измерителя нейтронного потока автоматизированного» (ИНПА, разработки ВНИИА им. Н.Л. Духова, Москва). Погрешность определения поглощенной дозы составляла 12–15%.

За мышами наблюдали ежедневно на протяжении всей их жизни, для выявления опухолевого ответа определяли динамику роста АКЭ, регистрировали продолжительность ремиссии, частоту рецидивов опухолей и СПЖ мышей с рецидивами и полностью «вылеченных». Животных в терминальном состоянии подвергали эвтаназии, считая этот день датой гибели.

Динамику роста АКЭ определяли по объему опухоли дважды в неделю в течение месяца. Для вычисления объема опухоли у каждой мыши измеряли три ортогональных диаметра, и объем



Рис. 2. Положение мышей во время облучения нейтронами на нейтронном генераторе НГ-14.

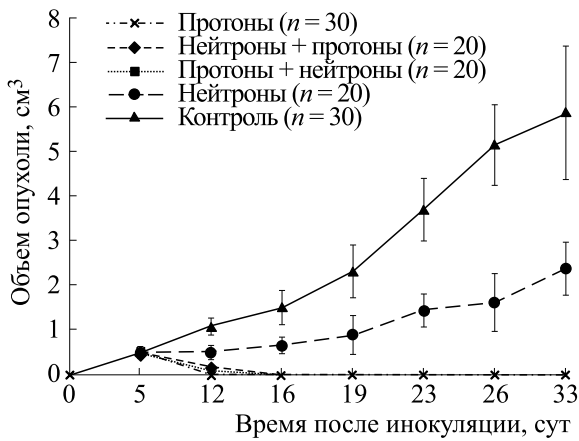


Рис. 3. Динамика роста АКЭ у мышей после облучения пучком протонов 40 + 40 Гр и их сочетанного воздействия с нейтронами в дозе 5 Гр. Данные представлены как среднее значение \pm SD, $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем.

опухоли в см^3 рассчитывали по следующей формуле [34]:

$$V = \pi/6 \cdot d1 \cdot d2 \cdot d3,$$

где $d1-d3$ — три ортогональных диаметра. Для оценки острых кожных реакций после облучения опухоли, локализованной на бедре левой задней лапы мыши, использовали шкалу оценки радиационной токсичности RTOG/EORTC [35]. За мышами ежедневно наблюдали с первых по сороковые сутки после облучения и оценивали общее количество животных с кожными реакциями, тип и степень повреждений и продолжительность заживления. После максимального проявления реакций у мышей повреждения кожи купировали с помощью консервативной терапии 15% раствором диметилсульфоксида (ОАО «Татхимфарм-

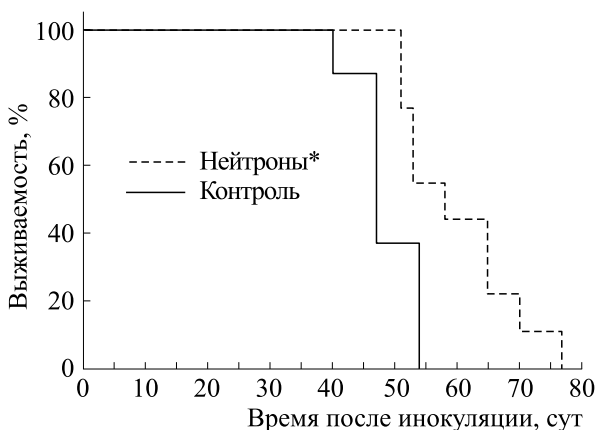


Рис. 4. Динамика гибели мышей-опухоленосителей после облучения нейтронами в дозе 5 Гр по сравнению с контрольной группой (* — $p \leq 0.05$).

препараты», Россия) и линиментами или мазями оксикортом (Тархоминские фармацевтические заводы Польфа, Польша) и флуцинаром (Jelfa SA, Польша).

Статистическую оценку различий между группами, имеющими нормальное распределение, проводили с помощью критерия Стьюдента; в остальных случаях использовали непараметрический U -критерий Манна–Уитни. Показатели выживаемости мышей сравнивали с помощью непараметрических критериев: критерия Гехана–Вилкоксона для оценки продолжительности жизни погибших от облучения животных и логрангового критерия для сравнения 30-суточной выживаемости. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 3 представлены кривые роста АКЭ у мышей после облучения нейтронами и протонами в разной последовательности. Во всех группах как при сочетанном, так и только при протонном облучении у всех мышей наблюдалась регрессия первичного опухолевого узла через неделю после облучения и отсутствие вторичного роста опухоли в течение месяца.

В группе мышей с АКЭ, облученной только нейтронами, у всех животных наблюдался рост опухоли, но скорость роста по сравнению с необлученным контролем была значительно ниже. Время задержки роста опухоли [36], которое вычислялось как разница между средним временем роста опухоли (время, необходимое для того, чтобы опухоль стала в пять раз больше по отношению к исходному объему) в группе нейтронного облучения и необлученного контроля, составило 15 суток, затем опухоли увеличивались с одинаковой скоростью. На рис. 4 представлена динамика гибели мышей с АКЭ в группе, облученной нейтронами, по сравнению с необлученными мышами-опухоленосителями. Задержка роста опухолей после нейтронного облучения увеличила максимальную продолжительность жизни мышей с опухолями до 77 суток по сравнению с контролем, где она равна 54 суткам, а СПЖ животных облученной группы увеличилось на 15 суток (рис. 4).

Одновременно у мышей оценивали тяжесть и течение острых лучевых поражений кожи в области облучения. В связи с тем, что пальпируемый объем опухоли был соизмерим с размером лапы животного, и опухолевый узел примыкал к кожным покровам, то при облучении кожа получала значительную дозу. Время латентного периода развития повреждений кожи в группе нейтроны составило 16 суток, кожные поражения наблюдались у 50% мышей и достигали максимальной

Таблица 1. Ранние лучевые реакции кожи у мышей после облучения АКЭ нейтронами и протонами по классификации RTOG/EORTC-95

Лучевые реакции	Развитие лучевых реакций, %			
	нейтроны	протоны	нейтроны + протоны	протоны + нейтроны
0 – нет проявлений	50%	–	–	–
1 – умеренная эритема, эпиляция, сухой эпидермит	10%	–	–	28.6%
2 – яркая эритема, островковый влажный эпидермит, умеренный отек	–	4.2%	–	–
3 – сливной влажный эпидермит, отек с давлением	–	50%	12.5%	57.1%
4 – язва, кровотечение, некроз, глубокое повреждение тканей	40%	45.8%	87.5%	14.3%

степени у 40% животных к 30 суткам после облучения. В экспериментальных группах протонного и сочетанного облучения время латентного периода было одинаковым и составляло 10–12 суток. В группе «нейтроны+протоны» кожные реакции на 13-е сутки наблюдались у 100% мышей, в группе «протоны» – у 70.8%, а в группе «протоны+нейтроны» – только у 43% мышей. Период проявления выраженных лучевых поражений кожи составлял 5–7 суток для всех групп, однако тяжесть кожных реакций была различна: в группе «нейтроны+протоны» самая тяжелая четвертая степень поражений, характеризующаяся появлением язв и некрозов, наблюдалась у 87.5%, в группе «протоны» – у 46%, а в группе «протоны + нейтроны» – только у 14% мышей. Кроме того, в группе «протоны + нейтроны», в которой наблюдали самую низкую частоту общего количества кожных реакций, у 29% мышей лучевые поражения были легкими и не развивались более первой степени (умеренная эритема, эпиляция, сухой эпидермит) (табл. 1).

Облучение опухоли только нейтронами в дозе 5 Гр приводило к развитию самой тяжелой степени кожных повреждений у 40% мышей, почти столько же, что и при действии двух фракций по 40 Гр протонного излучения, а сочетанное облучение нейтронами до протонов почти в два раза увеличивало частоту наиболее тяжелых кожных реакций по сравнению с одним только протонным облучением. Неожиданным оказалось то, что в варианте, где мыши облучались нейтронами после ТСПП, наблюдалась самая благополучная картина лучевых последствий: низкая доля мышей с четвертой степенью поражения кожи, и у 30% мышей была небольшая степень выраженности поражений. Длительность репаративного периода повреждений кожи была практически одинаковой для всех облученных животных, и составляла 30–35 суток с момента появления первых реакций, но волосяной покров в месте облучения опухоли восстановился к 40 суткам в

группе «нейтроны + протоны» только у 28%, в группе «протоны» – у 45% и в группе «протоны + нейтроны» – у 50% мышей. Таким образом, по нескольким параметрам, характеризующим повреждение кожи (доля мышей с кожными реакциями, соотношение разных степеней тяжести, скорости восстановления повреждений), показано влияние последовательности облучения разными типами излучения, поскольку предварительное облучение нейтронами в дозе 5 Гр перед протонным облучением значительно усиливает эту категорию побочных последствий, что приводит к дополнительной интоксикации мышей, связанной с острым и хроническим воспалением, и может существенно влиять на более отдаленные последствия.

Далее мы наблюдали за отдаленными лучевыми последствиями только у мышей с полной регрессией опухолевых узлов. Через 35–46 суток после последнего облучения во всех группах наблюдали первые случаи возобновления роста опухолей у мышей. Средняя продолжительность безрецидивного периода в группе «протоны» составила 85 суток, а в группах с разной последовательностью излучений срок ремиссии был ниже и составлял 43 и 60 суток (табл. 2). СПЖ мышей без рецидивов в группах с воздействием нейтронов и протонов была достоверно меньше (118 и 124 суток) по сравнению с группой мышей, облученных только протонами (278 суток). СПЖ мышей с рецидивами в группе «протоны» составляла 115 суток после облучения; в группах «нейтроны + протоны» и «протоны + нейтроны» она была меньше, 65 и 80 дней соответственно.

На рис. 5 показана выраженность таких отдаленных эффектов, как доля мышей без опухолей, количество погибших мышей без опухолей и появление рецидивов на 60-е сутки (рис. 5а) и на 90-е сутки (рис. 5б) в зависимости от последовательности облучения. На 60-е сутки после облучения количество излеченных животных в группе «протоны» было значительно больше ($p \leq 0.05$) по

Таблица 2. Средняя продолжительность безрецидивного периода и СПЖ мышей после сочетанного воздействия нейтронов и протонов

Условия облучения	Время появления первой рецидивной опухоли, сут	Средняя продолжительность безрецидивного периода, сут	СПЖ мышей, сут	
			С рецидивами	Без рецидивов
протоны (40+40 Гр)	35	85	115	278
нейтроны (5 Гр) + протоны (40+40 Гр)	39	43*	65*	118*
протоны (40+40 Гр) + нейтроны (5 Гр)	46	60	80	124*

Примечание. * – $p \leq 0.05$ по сравнению с группой протонного воздействия.

сравнению с таковым в группе «протоны + нейтроны»; максимальная гибель у мышей наблюдалась в группе «протоны + нейтроны», а количество рецидивов во всех группах было одинаковым. На 90-е сутки после облучения количество погибших животных в группе «протоны + нейтроны» значительно увеличилось, что не наблюдалось в других группах. Количество животных с рецидивами опухолей в группе «протоны» увеличилось почти вдвое, а в группе «протоны + нейтроны» – в полтора раза. У мышей, подвергшихся комбинированному облучению, все случаи возобновления роста опухоли наблюдались в течение пяти-двенадцати недель после облучения, в отличие от мышей, облученных только протонами, у которых возобновление роста опухоли наблюдалось в более поздние сроки, через 19–35 недель (рис. 6). На протяжении всего периода наблюдения доля мышей с возобновившимся ростом опухоли той же локализации, что и первичная, составил 36% в группе «протоны» и 50 и

43% – соответственно в группах «нейтроны + протоны» и «протоны + нейтроны».

На рис. 7 показано время роста рецидивных опухолей у мышей после протонного и комбинированного облучения, которое определялось как время, необходимое для пятикратного увеличения исходного пальпируемого объема (0.47 см^3). Времена роста рецидивов, полученные для всех животных, усредняли по каждой группе и рассчитывали время задержки роста опухоли как разницу между временем роста рецидивных опухолей экспериментальной группы и необлученного контроля [36]. Время задержки роста опухоли в группе «протоны» на 13-е сутки отличалось относительно контрольной группы, а для групп «нейтроны + протоны» и «протоны + нейтроны» было таким же, как и в контроле. Таким образом, в группе «протоны» рецидивные опухоли росли медленнее, чем в группах комбинированного облучения.

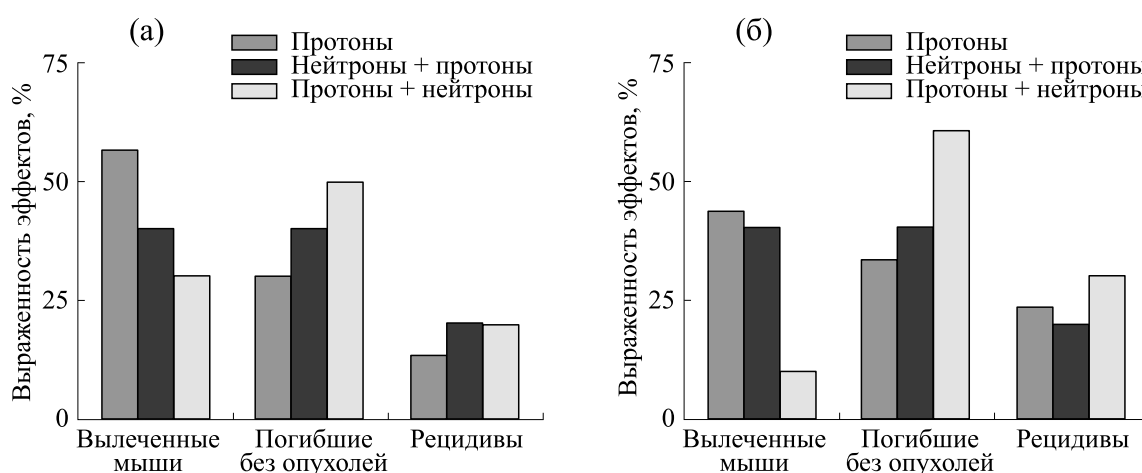


Рис. 5. Отдаленные эффекты у мышей с АКЭ после протонного и комбинированного облучения: на 60-е сутки (а) и на 90-е сутки (б).

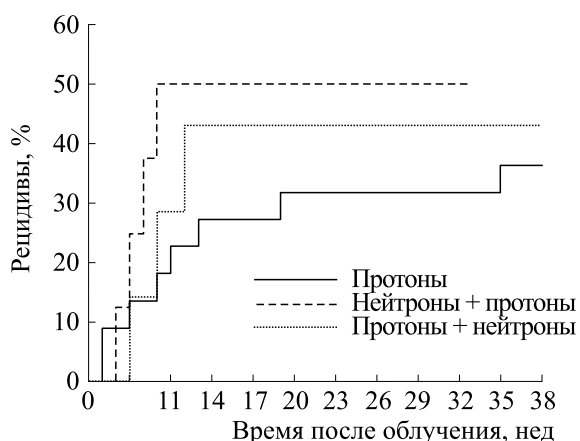


Рис. 6. Динамика появления вторичных опухолей после облучения пучком протонов 40 + 40 Гр и их сочетанного воздействия с нейтронами в дозе 5 Гр.

«Вылеченные» мыши, у которых опухолевый узел не развивался в месте облучения на протяжении всей жизни, в группах, подвергшихся комбинированному облучению, погибли раньше, чем в группе, подвергавшейся только протонному облучению. Максимальная продолжительность жизни в группе «нейтроны + протоны» составила 7 месяцев, в группе протоны + нейтроны – 11 месяцев, в группе протоны – 21 месяц.

Таким образом, анализ таких отдаленных последствий облучения, как время ремиссии, частота и скорость роста вторичных опухолей, продолжительность жизни мышей-опухоленосителей показал, что дополнительное воздействие нейтронов как до, так и после протонного облучения значительно ухудшает эти показатели эффективности терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ

По сравнению с фотонным излучением радиобиологическое действие адронов (протонов, нейтронов и ионов углерода) характеризуется индукцией преимущественно летальных повреждений ДНК и практически не зависит от фазы клеточного цикла. Протонное облучение значительно снижает коэффициент усиления кислорода в ткани, сводит к минимуму ускоренную репопуляцию опухолевых клеток, подавляет их способность к метастазированию и более эффективно повреждает радиорезистентные ОСК, что, как правило, является причиной возникновения вторичных злокачественных новообразований [1, 7]. В настоящее время происходит смена классических представлений о механизмах возникновения, роста и взаимодействия структурных компонентов опухоли, метастазирования и рецидива [37]. Это объясняется тем, что ключевым звеном в индук-

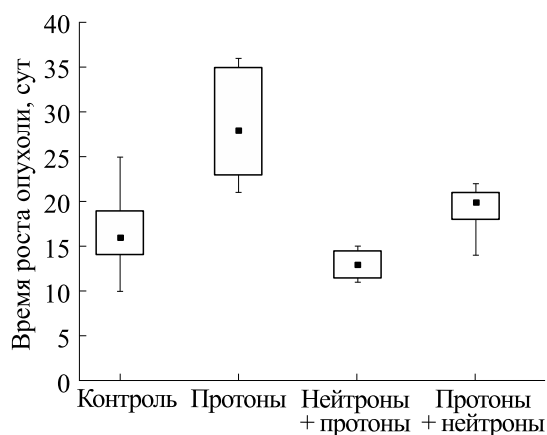


Рис. 7. Время роста рецидивных опухолей у мышей после протонного и комбинированного облучения.

ции развития опухоли считается достаточно небольшое количество (обычно всего 1–4%) ОСК, обладающих свойствами стволовых клеток: способностью к самовосстановлению, обновлению и дифференцировке, относительно более высокой радиорезистентностью и способностью к метастазированию. Показано, что количество ОСК в культурах различных тканей увеличивается после однократного облучения в диапазоне доз 1–10 Гр, а опухолевые не стволовые клетки погибают при увеличении дозы. После фракционированного рентгеновского облучения *in vivo* в суммарной дозе 10 Гр у всех больных раком верхних дыхательных путей увеличилось относительное количество ОСК [8]. По сравнению с гамма-излучением эквивалентные дозы низкоэнергетических протонов с энергией 3 МэВ более эффективно снижали популяцию клеток ОСК-подобной карциномы легкого; при этом экспрессия генов, участвующих в клеточной гибели, возросла в десять раз [17]. Эти результаты дают основание для более интенсивных поисков новых путей в адронной терапии для контроля резистентности новообразований к лучевой терапии и снижения частоты рецидивов, и одним из таких способов, на наш взгляд, является гипофракционированное высокодозное протонное облучение [10]. Представляется очевидным, что эксперименты на клеточных культурах не позволяют оценить реакцию сложной многофункциональной структуры опухоли, содержащей клетки с разной чувствительностью или даже совершенно противоположными ответами на одни и те же дозы облучения. Важнейшими критериями эффективности современной терапии онкологических заболеваний являются длительность безрецидивного периода, частота рецидивов и продолжительность жизни больных. В связи с этим для разработки новых схем фракционированного облучения при протонной тера-

пии необходимы модели опухолей на животных, позволяющие не только оценивать ранние противоопухолевые эффекты и реакции нормальных здоровых тканей, но и отслеживать динамику ремиссии, индукции рецидивов и выживания животных.

Здесь мы предприняли попытку повысить противоопухолевую эффективность облучения протонами в сочетании с нейтронным излучением в разной последовательности. Показано, что комбинированное облучение мышей нейтронами в дозе 5 Гр как до, так и после двукратного протонного облучения также, как и при облучении только пучком протонов, эффективно подавляло рост солидной АКЭ в течение месяца после воздействия. По частоте и тяжести лучевых поражений кожи, которая служили моделью ответа здоровых тканей, наблюдаемых через 15–40 сут после радиационной терапии, облучение нейтронами после протонного облучения приводило к значительному улучшению этих показателей по сравнению с одним протонным облучением, однако облучение нейтронами перед протонным облучением оказалось более повреждающим, чем в других вариантах. В работе [38] было показано, что воздействие излучения с высокой ЛПЭ (ионы углерода, нейтроны) перед облучением протонами приводит к более низкой выживаемости клеток китайского хомячка V14-150 (фибросаркома) по сравнению с облучением сначала протонами. Авторы предположили, что повреждения клеток, вызванные протонами с низкой ЛПЭ, репарируются в промежутке между фракциями, а повреждения, вызванные частицами с высокой ЛПЭ, были в основном нерепарируемы. Таким образом, порядок воздействия излучениями с низкой и высокой ЛПЭ при комбинированном воздействии на клетки имеет значение. В работе [39] отметили, что последовательность гамма-излучения и нейтронов при фракционированном облучении опухолей у животных и доля нейтронов в кумулятивной дозе имеют большое значение, поскольку облучение нейтронным излучением в дозе 2.5 Гр следует за фракционированным гамма-облучением. Облучение в дозе 28 Гр более эффективно подавляло рост опухоли и не влияло на кожные реакции по сравнению с облучением нейтронами до гамма-облучения.

При всех последовательностях облучения, использованных в нашей работе, наблюдалось полное подавление опухолевого роста, но реакции нормальных тканей сильно различались. У мышей с опухолями, подвергшихся комбинированному облучению, такие показатели эффективности лечения, как продолжительность ремиссии, частота повторного роста опухоли и СПЖ были значительно хуже, чем у животных, облученных только протонами. Из-за специфики распределения поглощенной энергии в веществе при дей-

ствии на опухоли частиц с высокими значениями ЛПЭ, таких как нейтроны, облучению подвергаются и здоровые ткани, что вызывает радиационные повреждения в клетках, окружающих опухоль. В нашей работе мы облучали опухоль, локализованную в бедре мыши, в которой количество миелокариоцитов в семь-восемь раз больше, чем в голени или предплечье [40]; предположительно, локальное облучение этой области нейтронами способствует дополнительному подавлению восстановления кроветворения, что приводит к уменьшению продолжительности жизни после комбинированного облучения. Кроме того, при локальном облучении нейтронами в относительно небольшой дозе охватывался больший объем здоровой ткани, окружающей опухоль, чем при высокоточном облучении сканирующим пучком протонов, что также могло негативно сказываться на состоянии мышей в отдаленные сроки. Ранее нами при облучении опухоли протонами была показана зависимость СПЖ мышей от объема облучения нормальной ткани, окружающей опухоль [26]. Возможно, негативное влияние комбинированного облучения на отдаленные последствия, связано и с тем, что ОБЭ нейтронов при прохождении возрастает обратно пропорционально дозе, что оказывает более сильное повреждающее действие на нормальные ткани вне опухоли [22].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что регистрация ранних и отдаленных последствий по нескольким критериям, позволяет более полно оценить эффективность схем облучения и, вероятно, эту информацию следует учитывать при выборе терапии той или иной опухоли в зависимости от ее локализации, размера, формы, близости к критическим органам и возможный вклад повреждения кожи в последствия лечения. Полученные данные выявили сложные закономерности реакции опухоли и здоровых тканей в зависимости от последовательности облучения при комбинированном воздействии излучений разного качества. На современном этапе развития протонной терапии становится очевидной необходимость дальнейшего накопления экспериментальных радиобиологических данных для корректного определения ОБЭ протонов в терапевтических условиях на моделях опухолей и нормальных тканей *in vivo* методами, аналогичными тем, что применяются для доклинических и клинических испытаний лекарственных средств.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.А. Лычагину, С.Н. Корякину и Т.С. Хозяшевой – сотрудникам отдела радиационной биофизики МРНЦ им. А.Ф. Цыба (филиала НМИЦ радиологии Минздрава России, Обнинск) за помощь в орга-

низации и проведении эксперимента по облучению нейтронами на оборудовании Центра.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена на базе ФТЦ Физического института им. П.Н. Лебедева и ИТЭБ РАН в рамках выполнения фундаментальных научных исследований по теме ГЗ № 075-00381-21-00 и за счет частичной финансовой поддержки из средств договора между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН № 06/20.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Исследования проводили в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (Federation of European laboratory animal science association, FELASA). Эксперименты получили одобрение Комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН, все процедуры проводились в соответствии с нормативно-правовыми актами по содержанию и использованию лабораторных животных (протокол №8/2020 от 17.02.2020).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Blanchard, G. B. Gunn, A. Lin, et al., *Semin. Radiat. Oncol.*, **28** (1), 53 (2018).
2. S. Baliga, L. Gandola, B. Timmermann, et al., *Pediatric Blood Cancer*, **9**, (2020).
3. F. Tommasino and M. Durante, *Cancers (Basel)*, **7** (1), 353 (2015).
4. T. Bortfeld, H. Paganetti, and H. Kooy, *Med. Physics*, **32** (6), 2048 (2005).
5. H. Suit, T. DeLaney, S. Goldberg, et al., *Radiother Oncol.*, **95** (1), 3 (2010).
6. A. Luhr, C. Neubeck, M. Krause, et al., *Clin. Translat. Radiat. Oncol.*, **9**, 35 (2018).
7. H. Paganetti, E. Blakely, A. Carabe-Fernandez, et al., *Med. Physics* **46** (3), 53 (2019).
8. E. S. Diffenderfer, I. I. Verginadis, M. M. Kim, et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **106** (2), 440 (2020).
9. Y. Liu, P. Zhang, F. Li, et al., *Theranostics*, **8** (7), 1824 (2018).
10. В. Е. Балакин, А. Е. Шемяков, С. И. Заичкина и др., *Биофизика*, **61** (4), 808 (2016).
11. T. Belyakova, V. Balakin, S. Zaichkina, et al., in *Proc. Int. Conf. on Radiation Applications in Physics, Chemistry, Biology, Medical Sciences, Engineering and Environmental Sciences* (2019), p. 110.
12. S. Tran, E. Puric, M. Walser, et al., *Br. J. Radiol.*, **93** (1107), 20180883 (2020).
13. H. Ghaffari, J. Beik, A. Talebi, et al., *Clin. Translat. Oncol.*, **20** (12), 1502 (2018).
14. C. R. Arnold, J. Mangesius, I. I. Skvortsova, et al., *Front. Oncol.*, **10**, 164 (2020).
15. S. Chiblak, Z. Tang, B. Campos, et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **95** (1), 112 (2016).
16. E. T. Vitti and J. L. Parsons, *Cancers (Basel)*, **11** (7), 946 (2019).
17. H. Narang, A. Kumar, N. Bhat, et al., *Mutat. Res.*, **780**, 35 (2015).
18. M. F. Timoshchuk, P. Dekker, D. S. Hippe, et al., *Oral Oncol.*, **88**, 51 (2019).
19. H. Cash, R. A. Harbison, N. Futran, et al., *Laryngoscope*. **131** (3), 541 (2021).
20. А. Д. Каприн и С. Е. Ульяненко, *Медицина: целевые проекты*, **23**, 56 (2016).
21. Y. Hirota, S. Masunaga, N. Kondo, et al., *J. Radiat. Res.*, **55** (1), 75 (2014).
22. B. Jones, *Front. Oncol.*, **10**, 1537 (2020).
23. Е. Е. Бекетов, Е. В. Исаева и С. Н. Корякин, *Радиация и риск*, **21** (3), 82 (2012).
24. С. Е. Ульяненко, С. Н. Корякин, Е. В. Исаева и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **56** (6), 598 (2016).
25. Е. В. Исаева, Е. Е. Бекетов, Н. В. Наседкина и др., *Радиация и риск*, **28** (1), 59 (2019).
26. В. Е. Балакин, А. Е. Шемяков, С. И. Заичкина и др., *Биофизика*, **62** (1), 161 (2017).
27. C. Peitzsch, A. Tyutyunnykova, K. Pantel, et al., *Seminars Cancer Biol.*, **44**, 10 (2017).
28. J. A. Smith, F. A. van den Broek, J. C. Martorell, et al., *Laboratory Animals*, **41** (2), 143 (2007).
29. S. Mishra, A. Tamta, M. Sarikhani, et al., *Sci. Rep.*, **8** (1), 5599 (2018).
30. E. V. Isaeva, E. E. Beketov, S. N. Koryakin, et al., *Radiat. Protection Dosimetry*, **161** (1–4), 478 (2014).
31. V. E. Balakin, A. L. Bazhan, V. A. Alexandrov, et al., in *Proc. 27th Russian Particle Accelerator Conf.* (2021), p. 120.
32. *ICRU Report 62: Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy* (International Commission on Radiation Units and Measurements, Bethesda, 1999).
33. С. В. Сыромуков, Р. В. Добров, А. В. Степнов и др., *Атомная энергия*, **112** (6), 350 (2014).
34. B. Sorensen, M. Horsman, J. Alsner, et al., *Acta Oncol.*, **54** (9), 1623 (2015).
35. J. D. Cox, J. Stetz, and T. F. Pajak, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **31** (5), 1341 (1995).
36. K. Ando, S. Koike, A. Uzawa, et al., *J. Radiat. Res.*, **46** (1), 51 (2005).

37. R. French and S. Pauklin, *Int. J. Cancer*, **148** (12), 2884 (2021).
38. M. Troshina, E. Koryakina, V. Potetnya, et al., in *Proc. Eighth international conference on radiation in various fields of research* (2020), p. 126.
39. G. M. Obaturov, V. A. Sokolov, S. E. Ulyanenko, et al., *Radiat. Biol. Radioecology*, **37** (4), 475 (1997).
40. Г. С. Стрелин, Н. К. Шмидт, Н. Н. Сильченко и др., *Эффект экранирования части костного мозга при фракционированном облучении организма* (Медицина, Л., 1978).

Early and Remote Sequence Effect of Neutron and Proton Irradiation on the Tumor Response of Solid Ehrlich Carcinoma and Skin Reactions in Mice

O.M. Rozanova*, E.N. Smirnova*, T.A. Belyakova**, N.S. Strelnikova**,
A.E. Shemyakov*, **, and A.V. Smirnov**

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Physical-Technical Center of Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences,
Akademicheskii proezd 2/110, Protvino, Moscow Region, 142281 Russia*

The present study evaluated the sequence effect of proton (at a total dose of 80 Gy) and neutron radiation (at a dose of 5 Gy) on tumor response and skin reactions in mice bearing solid tumor of Ehrlich ascites carcinoma exposed to combined radiation. It was shown that neutron radiation used either before or after proton radiation effectively reduces proliferation of solid Ehrlich ascites carcinoma in mice for one month after irradiation. Our work showed that parameter values for the frequency and severity of radiation-induced skin reactions in mice at 15–40 days postirradiation were much better when animals were exposed to neutrons after proton therapy, as opposed to those obtained after the use of only proton therapy. However, neutron exposure process before proton irradiation was rather damaging sequence than another one. It was also found that the tumor relapse rate in the groups of animals exposed to combined radiation was higher, and the overall lifespan was shorter than that in the group of mice irradiated only with protons.

Keywords: neutrons, protons, Ehrlich ascites carcinoma, radiation-induced skin reaction, tumor relapses, mice