

УДК 577.3:599.323.4

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТОНКОГО СКАНИРУЮЩЕГО ПУЧКА ПРОТОНОВ НА МЫШАХ *in vivo*

© 2021 г. Член-корреспондент РАН В. Е. Балакин<sup>1,\*</sup>, О. М. Розанова<sup>2</sup>, Е. Н. Смирнова<sup>2</sup>, Т. А. Белякова<sup>1</sup>, А. Е. Шемяков<sup>1,2</sup>, Н. С. Стрельникова<sup>1</sup>

Поступило 17.03.2021 г.  
После доработки 31.03.2021 г.  
Принято к публикации 31.03.2021 г.

Изучено действие тонкого сканирующего пучка протонов в диапазоне доз 4.5–15 Гр на радиочувствительность мышей при облучении в двух областях кривой Брэгга по критериям 30-дневной выживаемости, динамики гибели, средней продолжительности жизни мышей. Были определены величины относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов до и в пике Брэгга относительно рентгеновского излучения, которые составили по показателю  $LD_{50/30}$  0.86 и 0.94 соответственно, а по критерию 30-суточной выживаемости в дозе 6.5 Гр – 0.83 и 0.84. При близких значениях ОБЭ для протонов в разных областях кривой Брэгга выявлены существенные различия в динамике течения лучевой болезни, что свидетельствует о разном повреждении критических систем и органов животных, а также индукции специфических компенсаторных механизмов, участвующих в формировании стресс-ответов на организменном уровне.

**Ключевые слова:** тонкий сканирующий пучок протонов, относительная биологическая эффективность, выживаемость, мыши

**DOI:** 10.31857/S2686738921040053

С каждым годом в мире растет число онкологических заболеваний, и в большинстве случаев лучевая терапия является основным средством лечения. Обычно в качестве лучевой терапии используют фотоны, которые характеризуются экспоненциальным уменьшением дозы, т.е. торможение частиц происходит в основном перед опухолью в здоровых тканях, что способствует появлению острых лучевых поражений после лечения. В настоящее время все активнее для лечения рака применяют протоны, преимущества которых связаны с их дозовым распределением, описываемым кривой Брэгга: относительно низкой дозой на входе и наличием пика Брэгга – максимального энерговыделения в конце пробега частицы на заранее заданной глубине, непосредственно в опухоли, что позволяет не повреждать

окружающие здоровые ткани, снижая вероятность побочных лучевых реакций [1]. Протонную терапию (ПТ) рассматривают как альтернативу традиционной лучевой терапии, особенно в педиатрии [2] и для лечения опухолей сложных локализаций, близко расположенных к критически важным органам, например, опухоли глаз [3], легких [4], простаты [5]. Хотя физические свойства протонов хорошо изучены, об особенностях их биологического действия известно гораздо меньше. В клинической практике коэффициент относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонного излучения относительно высокоэнергетичных фотонов равен 1.1 [6]. В последние годы фиксированное значение ОБЭ ставится под сомнение с позиции оценки безопасности, так как если доза в опухоли слишком низкая, то риск рецидива увеличивается, а если превышена, то возрастает вероятность возникновения побочных эффектов [7]. В работе, проведенной на фибробластах человека AG01522 и клетках глиомы U87 с использованием моноэнергетических протонов с энергией 62 МэВ, было показано, что ОБЭ изменяется с 1.0 на входе в ткани до 1.3–1.4 в пике Брэгга [8]. Основной проблемой при исследовании действия ускоренных частиц на биологические объекты является то, что величина ОБЭ

<sup>1</sup> Физико-технический центр Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, Протвино, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

\*e-mail: balakin@ftcfian.ru

зависит от многих факторов, как биологического характера: вида, пола, возраста животного; линии культивируемых клеток млекопитающих; метода регистрации повреждений, концентрации кислорода в тканях, стадии клеточного цикла, условий культивирования *in vitro* и метаболизма *in vivo*, так и физико-технических характеристик облучения: способа доставки и расчета дозы, дозы за фракцию, величины линейной передачи энергии (ЛПЭ) частиц, состава и однородности пучка ионов и вторичного излучения. В последнее время медицинские центры для ПТ опухолей используют метод тонкого сканирующего пучка протонов (ТСПП), который обеспечивает наиболее эффективное лечение с модулированной интенсивностью, позволяя максимально снизить дозовую нагрузку на здоровые ткани. Дальнейшее улучшение качества ПТ можно достичь корректной оценкой ОБЭ по всему диапазону кривой Брэгга.

Большинство работ по определению величины ОБЭ протонов выполнено при облучении *in vitro* культур нормальных и опухолевых клеток с использованием низкоэнергетических пучков [9], и полученные результаты трудно экстраполировать для решения практических задач ПТ, при которой в современных центрах используют высокоэнергетические протоны. В данный момент начинают накапливаться экспериментальные данные по действию пучков протонов разных энергий, конфигураций и ЛПЭ на целый организм, которых пока недостаточно, и, как следствие, отсутствуют представления о специфике действия высокоэнергетических частиц на критические структуры и процессы в различных органах и тканях при тотальном или локальном облучении животных в дозах, рассчитанных для межпланетного полета, а также при дозах, которые планируют использовать для гипофракционированного облучения опухолей.

Целью работы являлись изучение радиочувствительности мышей в диапазоне доз 4.5–15 Гр после тотального облучения ТСПП в разных областях кривой Брэгга и определение коэффициента ОБЭ по тесту 30-суточной выживаемости.

Эксперименты проводили на 260 мышах самцах колонии SHK с массой тела 30–35 г, которых содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях [10], а план экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 8/2020 от 17.02.2020). Мыши были разделены на группы по 10–15 животных, и по отдельным экспериментальным точкам проведено 2–3 независимых эксперимента. Мышей облучали в пике и до

пика Брэгга в дозах 4.5–15 Гр. Облучение осуществлялось на протонном синхротроне (Комплекс ПТ “Прометеус”, ФТЦ ФИАН, Протвино) с применением технологии сканирующего пучка с одного направления в импульсном режиме (длительность импульса 200 мс, 1 импульс в 2 с) и сигмой пучка – 2.8–3.6 мм. Облучение животных проводилось путем сканирования пучком протонов всего тела с равномерным распределением дозы по всему объему. Перед облучением мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией ксилазин/золетиловой смеси (0.7/3.4 мг/кг). Животных по одному располагали перпендикулярно правой стороной тела к оси пучка на расстоянии 75 см от выпускного окна ускорителя. При облучении в модифицированном пике Брэгга перед контейнером с животным располагался 60 мм водный фантом, для смещения энергии протонов в диапазон более 70 МэВ, чтобы получить более однородное дозовое распределение в теле животного с хорошим градиентом доз на границах мишени. При облучении в модифицированном пике Брэгга мощность дозы была 0.82 Гр/мин, число частиц  $1.51 \times 10^{11}$ – $5.05 \times 10^{11}$  в зависимости от дозы, энергия частиц на выходе из ускорителя составляла 91–123 МэВ. Среднее значение ЛПЭ, рассчитанное по программе планирования, в модифицированном пике было равно  $2.5 \pm 0.7$  кэВ/мкм. При облучении до пика Брэгга энергия частиц составляла 150 МэВ, что соответствует ЛПЭ на плато  $0.7 \pm 0.04$  кэВ/мкм, при мощности дозы 0.47 Гр/мин (число частиц  $3.67 \times 10^{11}$ – $1.22 \times 10^{12}$ ). Контролировали дозу клиническим дозиметром на основе алмазного детектора (ИФТП, Россия) и дозиметрической пленкой (ЕВТ2, США), погрешность поглощенной дозы протонов составляла около 5%.

Для определения коэффициента ОБЭ контрольные группы мышей были облучены жестким рентгеновским излучением (РИ) на установке РУТ (200 кВ, 2 кэВ/мкм, 1 Гр/мин; Центр коллективного пользования “Источники излучения” ИБК, Пушкино). Облучение мышей РИ, которое является фотонным, происходило равномерно по всему телу. Животные этой группы также служили sham-контролем, так как подвергались анестезии и транспортировке к источникам облучения.

Затем в течение 30 сут после радиационного воздействия ежедневно учитывали число павших животных, а также мышей взвешивали дважды в неделю. По итогам наблюдений получали кривые выживаемости, по которым оценивали динамику гибели и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) погибших от облучения мышей.

Полученные данные подвергали стандартной статистической обработке с вычислением среднего значения показателя и его ошибки. Достоверность различий между выборками оценивали

**Таблица 1.** Выживаемость и СПЖ после облучения ТСПП до и в пике Брэгга в дозах 4.5–15 Гр

Доза, Гр	До пика Брэгга		В пике Брэгга	
	Выживаемость, %	СПЖ, сут	Выживаемость, %	СПЖ, сут
4.5	93	29 ± 1	88	22 ± 7
6.5	64	16 ± 8	40	23 ± 8
8.5	33	10 ± 6	30	14 ± 9
10.5	11	13 ± 5	10	10 ± 3
12.5	0	6 ± 1	10	6 ± 4
15	0	6 ± 1	0	5 ± 3

с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Вероятность ошибки  $p < 0.05$  считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных.

В табл. 1 представлены данные о выживаемости и СПЖ погибших мышей при облучении ТСПП до и в пике Брэгга в диапазоне доз 4.5–15 Гр.

Гибель животных в обоих вариантах облучения протонами зависела от дозы и наблюдалась при всех исследованных дозах. После облучения в дозах 4.5 и 6.5 Гр, как до, так и в пике Брэгга, гибель мышей начиналась с 10-го дня, что свидетельствует о развитии костномозговой формы хронической лучевой болезни [11]. Гибель мышей, облученных протонами в пике Брэгга в дозах 8.5 Гр и выше, начиналась на 3–5-й день, что свидетельствует об индукции кишечной формы острой лучевой болезни, а при облучении до пика Брэгга такое течение болезни наблюдалось только после облучения в дозе 12.5 Гр, что сопровождалось падением веса животных на 23–27% перед гибелью.

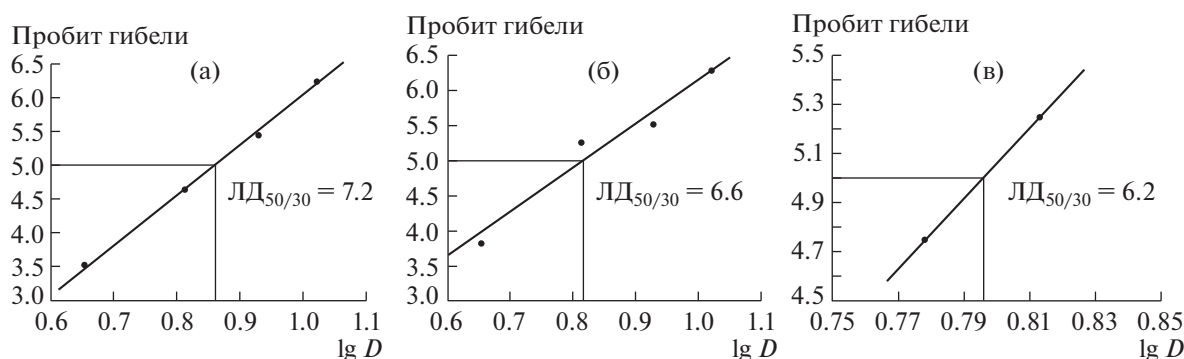
После действия РИ в дозе 8.5 Гр более выражена была костномозговая форма лучевой болезни и 100% гибель наблюдалась к 14 сут в отличие от протонного излучения, после действия которого в пике Брэгга через 30 сут погибло 70%, а до пика – 67% мышей. СПЖ погибших от облучения мы-

шей также была дозозависимой, но достоверных отличий между исследуемыми группами не наблюдалось.

Для определения величины дозы  $LD_{50/30}$ , при которой выживает 50% животных в течение месяца и которая является базовой радиобиологической характеристикой излучения, в качестве метода преобразования кривых смертности был использован пробит-анализ [12]. На рис. 1 представлены результаты пробит-анализа, на основании которого были вычислены значения  $LD_{50/30}$ : для ТСПП до пика Брэгга оно равнялось 7.2 Гр, в пике Брэгга – 6.6 Гр, а для РИ – 6.2 Гр.

По критерию значений  $LD_{50/30}$  была вычислена величина ОБЭ до и в пике Брэгга, которая составила 0.86 и 0.94 соответственно, статистически значимой разницы между величинами выявлено не было. Исходя из того, что полученные значения  $LD_{50/30}$  лежали в диапазоне доз 6.2–7.2 Гр, для оценки ОБЭ по критерию 30-суточной выживаемости была выбрана доза 6.5 Гр.

Из рис. 2 видно, что, несмотря на то, что после облучения мышей в дозе 6.5 Гр протонами с разной ЛПЭ разница в динамике гибели животных незначительная, но к 30 сут в пике Брэгга их погибает 60%, а до пика – 36%. На основании этих результатов были рассчитаны значения коэффи-



**Рис. 1.** Пробит-функция 30-суточной выживаемости мышей после воздействия ТСПП (а) до пика Брэгга ( $y = 7.3 \log D - 1.3$ ); (б) в пике Брэгга ( $y = 6.3 \log D - 0.2$ ); (в) рентгеновское излучение ( $y = 14.4 \log D - 6.4$ ).

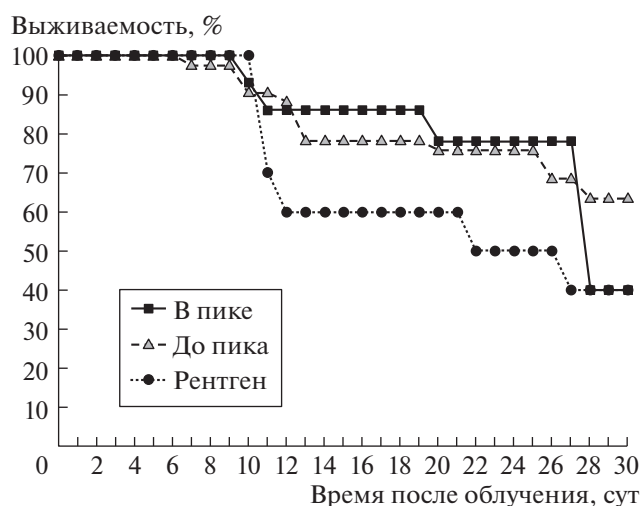


Рис. 2. Динамика гибели мышей после облучения ТСПП и рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр.

циентов ОБЭ при облучении мышей ТСПП в разных участках кривой Брэгга относительно РИ по интегральному показателю — площади под кривыми выживаемости животных в течение 30 сут. Коэффициент ОБЭ до пика Брэгга составил 0.84, а в пике — 0.83. Полученные значения согласуются с результатами ряда исследований определения ОБЭ по острым кожным реакциям мышей при облучении пучком протонов в пике Брэгга задней лапы и жесткого РИ, где величина ОБЭ находится в диапазоне 0.85–0.97 [13, 14]. Ранее нами было определено значение ОБЭ при общем облучении ТСПП мышей в пике Брэгга в дозе 1.5 Гр через 28 ч после воздействия по критерию цитогенетических нарушений в эритроцитах костного мозга, равное 1.15 [15]. Это значение также хорошо согласуется с данными, полученными на культурах клеток [16], и отражает раннюю радиочувствительность стволовых клеток костного мозга, одного из важнейших органов кроветворной и иммунной систем, обладающим огромным репопуляционным потенциалом. В данной работе по критерию выживаемости при облучении мышей в пике Брэгга значения ОБЭ были ниже и составили 0.83 и 0.94, что показывает отсроченную реализацию ответов всех чувствительных к облучению органов, обладающих быстроделющимися клетками, прежде всего костного мозга и желудочно-кишечного тракта. Кроме того, в нашей работе ОБЭ рассчитывалось относительно РИ с ЛПЭ, сопоставимой с ЛПЭ протонов в пике Брэгга, и ОБЭ которого по отношению к  $\gamma$ -излучению  $^{60}\text{Co}$  равен 1.1–1.2 [17], поэтому полученные нами коэффициенты *in vivo* близки к значениям, принятым на данный момент в клиниках. Полученные нами результаты демонстрируют также зависимость значения ОБЭ от объекта, дозы, критериев регистрации повре-

ждений и контрольного облучения, относительно которого высчитывается коэффициент.

Используемая в нашей работе экспериментальная модель позволила определить величину ОБЭ несколькими способами на основе кривых выживаемости мышей в диапазоне доз, которые применяются также для оценки ОБЭ в условиях *in vitro* на культурах клеток млекопитающих. Ранее на других ускорителях с использованием пассивно-рассеянных пучков протонов разных энергий на животных были получены противоречивые данные о связи ЛПЭ с ОБЭ в отношении отдаленных последствий облучения [18]. В экспериментах на культурах и тканях млекопитающих при оценке краткосрочных эффектов протонов при аналогичных дозах было определено, что в низком диапазоне ЛПЭ 0.3–10 кэВ/мкм величина ОБЭ протонов ниже или близка 1, и при 2–3-кратном увеличении ЛПЭ не наблюдается роста ОБЭ [19], в отличие от других ускоренных частиц, которые применяются в радиотерапии, ионов углерода и нейтронов, ЛПЭ которых значительно выше.

Таким образом, несмотря на близкие значения ОБЭ протонного излучения в разных областях кривой Брэгга, по динамике гибели мышей были выявлены резкие различия в развитии лучевой болезни в зависимости от дозы облучения, что свидетельствует о специфике повреждений критических систем и органов, индукции разнонаправленных компенсаторных механизмов, участвующих в формировании отдаленных реакций на тканевом и организменном уровне, приводящих в итоге к одинаковой гибели животных. В нашей работе при использовании нового способа доставки дозы протонов с помощью сканирования мишени баллистическим пучком частиц при об-

лучении до и в пике Брэгга было показано, что ОБЭ по критерию выживаемости мышей близко к 1 и не зависит от ЛПЭ. Полученные данные позволят более широко использовать возможности нового комплекса “Прометеус” для ПТ, разработки и поиска новых радиопротекторов, а также корректировать радиационные риски от галактических космических лучей при длительных полетах.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по определению величины относительной биологической эффективности тонкого сканирующего пучка протонов на мышах *in vivo* выполнена на базе ФТЦ ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева и ФГБУН ИТЭБ РАН в рамках выполнения фундаментальных научных исследований по темам ГЗ при частичной финансовой поддержке договора НИР № 06/20 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

#### 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), а план экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 8/2020 от 17.02.2020).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ilicic K., Combs S.E., Schmid, T.E.* New insights in the relative radiobiological effectiveness of proton irradiation // *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 2018. V. 13. № 6.
2. *Thomas H., Timmermann B.* Paediatric proton therapy // *Br. J. Radiol.* 2020. V. 93. № 1107.
3. *Hu W., Hu J., Gao J., et al.* Outcomes of orbital malignancies treated with eye-sparing surgery and adjuvant particle radiotherapy: a retrospective study // *BMC Cancer.* 2019. V. 19. № 776.
4. *Vyfhuis M.A.L., Onyeuku N., Diwanji T., et al.* Advances in proton therapy in lung cancer // *Ther. Adv. Respir. Dis.* 2018. V. 12.
5. *Kamran S.C., Light J.O., Efstathiou J.A.* Proton versus photon-based radiation therapy for prostate cancer: emerging evidence and considerations in the era of value-based cancer care // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2019. V. 22. № 4. P. 509–521.
6. *Paganetti H., Blakely E., Carabe-Fernandez A., et al.* Report of the AAPM TG-256 on the relative biological effectiveness of proton beams in radiation therapy // *Med. Phys.* 2019. V. 46. № 3.
7. *Mohan R., Peeler C.R., Guan F., et al.* Radiobiological issues in proton therapy // *Acta Oncol.* 2017. V. 56. № 11. P. 1367–1373.
8. *Chaudhary P., Marshall T.I., Perozziello F.M., et al.* Relative biological effectiveness variation along monoenergetic and modulated Bragg peaks of a 62-MeV therapeutic proton beam: a preclinical assessment // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014. V. 90. № 1. P. 27–35.
9. *Bao C., Sun Y., Dong Y., et al.* The relative biological effectiveness of proton and carbon ion beams in photon-sensitive and resistant nasopharyngeal cancer cells // *Translational Cancer Research.* 2018. V. 7. № 1. P. 170–179.
10. *Smith J., van den Broek F., Martorell J., et al.* Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of the FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments // *Laboratory Animals.* 2007. V. 41. № 2. P. 143–160.
11. *Ярмоленко С.П., Вайнсон А.А.* Радиобиология человека и животных. М.: Высшая школа; 2004.
12. *Ульяненко С.Е., Корякин С.Н., Исаева Е.В., и др.* Оценка биологической эффективности нейтронного излучения реактора БАРС-6 с различной мощностью дозы по критерию выживаемости мышей // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2016. Т. 56. № 6. С. 598–605.
13. *Tatsuzaki H., Inada T., Shimizu T., et al.* Early skin reaction following 250 MeV proton peak irradiation // *J. Radiat. Res.* 1987. V. 28. № 2. P. 150–155.
14. *Sorensen B.S., Bassler N., Nielsen S., et al.* Relative biological effectiveness (RBE) and distal edge effects of proton radiation on early damage in vivo // *Acta Oncol.* 2017. V. 56. № 11. P. 1387–1391.
15. *Balakin V.E., Rozanova O.M., Smirnova E.N., et al.* The Effect of Low and Medium Doses of Proton Pencil Scanning Beam on the Blood-Forming Organs during Total Irradiation of Mice // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 494. № 1. P. 231–234.
16. *Koryakina E., Troshina M., Potetnya V., et al.* Biological efficiency of a scanning proton beam under different irradiation modes in vitro. In: Book of Abstracts. Eighth international conference on radiation in various fields of research; Virtual conference. 2020. 125.
17. *Spadinger I., Palcic B.* The relative biological effectiveness of 60Co gamma-rays, 55 kVp X-rays, 250 kVp X-rays, and 11 MeV electrons at low doses // *Int. J. Radiat. Biol.* 1992. V. 61. № 3. P. 345–353.
18. *Жуковская Н.Е., Черножукова Е.М., ред.* Проблемы космической биологии. Т. 60. Биофизические основы действия космической радиации и излучений ускорителей. Л.: Наука; 1989.
19. *Бекетов Е.Е., Исаева Е.В., Наседкина Н.В. и др.* Равномерность биологической дозы в распределенном пике Брэгга терапевтической установки со сканирующим пучком протонов // *Вопросы онкологии.* 2019. Т. 65. № 4. С. 532–536.

**ASSESSMENT OF THE RELATIVE BIOLOGICAL EFFICIENCY OF PENCIL BEAM SCANNING OF PROTONS IN MICE *IN VIVO***

Corresponding Member of the RAS V. E. Balakin<sup>a,#</sup>, O. M. Rozanova<sup>b</sup>, E. N. Smirnova<sup>b</sup>, T. A. Belyakova<sup>a</sup>,  
A. E. Shemyakov<sup>a,b</sup>, and N. I. Strelnikova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Physical Technical Center, P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences, Protvino, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: balakin@ftcfian.ru

The effect of proton pencil beam scanning in the dose range of 4.5–15 Gy on the radiosensitivity of mice under irradiation in two regions of the Bragg curve was studied according to the criteria of 30-day survival, dynamics of death, and average lifespan of mice. The relative biological effectiveness (RBE) value, determined by the LD<sub>50/30</sub> index, of protons relative to X-ray radiation before the Bragg peak is 0.86, in the Bragg peak it is 0.94, and as calculation by the criterion of 30-day survival, at a dose of 6.5 Gy it was 0.83 and 0.84, respectively. With similar RBE values for protons in different regions of the Bragg curve, significant differences were revealed in the dynamics of the course of radiation sickness, which indicates different damage to critical systems and organs of animals and the induction of compensatory mechanisms involved in the formation of stress responses at the organismal level.

*Keywords:* pencil beam scanning of protons, relative biological effectiveness value, survival, mice