DOI: 10.21870/0131-3878-2020-29-2-101-114

УДК 612.014.482:616-006.04]-092.9

Действие γ -излучения и сканирующего пучка протонов на морфофункциональные характеристики саркомы М-1 крыс

Южаков В.В., Корчагина К.С., Фомина Н.К., Корякин С.Н., Соловьев А.Н., Ингель И.Э.,
Корецкая А.Е., Севаньяева Л.Е., Яковлева Н.Д., Цыганова М.Г.

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск

Протонная терапия (ПТ) считается одним из наиболее эффективных методов лучевого поражения опухолей, расположенных близко к критическим органам. В настоящее время физические свойства протонных пучков относительно хорошо изучены, однако всё ещё остаются вопросы относительно их биологической эффективности. Успех радиотерапии злокачественных новообразований во многом зависит от чувствительности неопластических клеток к действию ионизирующих излучений. Одним из молекулярно-биологических маркеров, позволяющих предсказывать радиочувствительность опухолей, прогнозировать развитие и исход заболевания является продукт экспрессии мутантного гена-онкосупрессора p53 (mt p53). Более чем у 50% онкологических больных в неоплазиях обнаруживается mt p53. Тем не менее, сведения о его вовлечении в чувствительность опухолей к ПТ практически отсутствуют. В данной работе изучали эффективность воздействия γ -квантов ^{60}Co и сканирующего пучка протонов на морфофункциональные характеристики положительной по mt p53 саркоме М-1. Методы исследования включали иммуногистохимическое окрашивание на онкопротеин p53, ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) и маркер эндотелия – CD31, а также определение индексов патологических митозов и апоптоза опухолевых клеток. Согласно полученным результатам, противоопухолевая эффективность γ - и протонного излучений определяется разным уровнем снижения репопуляционной активности неопластических клеток, индукции патологических митозов и апоптоза. Расчётные значения относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов по снижению PCNA-положительной фракции опухолевых клеток, увеличению содержания патологических митозов и индуцированному апоптозу составили 1,3; 1,4 и 1,6 соответственно.

Ключевые слова: γ -излучение, протоны, ОБЭ, противоопухолевая эффективность, саркома М-1, мутантный ген p53, патологические митозы, апоптоз, ангиогенез, иммуногистохимия, PCNA, CD31.

Введение

В последние годы в радиационной онкологии всё чаще и успешно применяется протонная терапия (ПТ), которая имеет потенциальное преимущество относительно конвенциональной фотонной терапии и считается одним из наиболее безопасных и эффективных методов лучевого поражения опухолей, расположенных близко к критическим органам [1]. Накопленный клинический опыт подтверждает эффективность ПТ для новообразований разного гистогенеза и локализации, таких как меланома глаза, опухоли центральной нервной системы, хондромы и хондросаркомы основания черепа, опухоли головы и шеи, злокачественные опухоли у детей [2, 3].

Основные предпосылки применения пучков ускоренных протонов для терапии злокачественных новообразований основаны на особенностях глубинного распределения поглощённой дозы протонов с максимумом в пике Брэгга и быстрым спадом дозы за ним практически до нуля в конечной точке пробега этих частиц [2]. Совмещение нескольких пиков Брэгга по глубине позволяет создать модифицированный пик Брэгга, обеспечивающий конформное облучение опухоли [4].

Южаков В.В.* – зав. лаб., к.м.н.; Корчагина К.С. – научн. сотр.; Фомина Н.К. – ст. научн. сотр., к.б.н.; Корякин С.Н. – зав. отд., к.б.н.; Соловьев А.Н. – зав. лаб., к.ф.-м.н.; Ингель И.Э. – ст. научн. сотр., к.б.н.; Корецкая А.Е. – мл. научн. сотр.; Севаньяева Л.Е. – ст. научн. сотр.; Яковлева Н.Д. – вед. научн. сотр., к.б.н.; Цыганова М.Г. – научн. сотр. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

*Контакты: 249035, Калужская обл., Обнинск, ул. Королёва, 4. Тел.: +7 (903) 635-79-71; e-mail: yuzh_vad@mail.ru.

Преимущества применения протонного излучения можно использовать для значительного снижения дозы облучения нормальных тканей, расположенных проксимально и дистально относительно облучаемой опухоли. Последнее, в свою очередь, позволяет применить эскалацию доз лучевой нагрузки на опухоли, что потенциально улучшает локальный контроль и выживаемость пациентов, одновременно уменьшая радиотоксичность [1], а при лечении опухолей у детей – снижает интегральную дозу ионизирующего излучения на организм [5].

Изучение радиобиологических эффектов протонов с учётом особенностей распределения их поглощённой дозы в тканях ведётся на всех уровнях – от субклеточного до организменного, тем не менее, нерешённые вопросы всё ещё остаются [6-8]. Так, в настоящее время в протонной лучевой терапии обычно предполагается постоянное значение относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов, равное 1,1, независимо от физических свойств протонных пучков и биологических систем. Однако, по данным многочисленных экспериментальных исследований, обобщённых в обзорах [5, 8] ОБЭ этих частиц по отношению к γ -излучению ^{60}Co может варьировать от 0,8 до 1,7 и зависит от величины линейной передачи энергии (ЛПЭ), уровня и мощности подведённой дозы, типа клеток и тканей, исследуемого эффекта, а также меняется по всей протяжённости модифицированного пика Брэгга.

Успех лучевого лечения онкологических заболеваний во многом зависит от резистентности опухолевых клеток к действию ионизирующих излучений. В основе такой радиоустойчивости может лежать гипоксическое состояние клеточной популяции опухоли, повышенная способность опухолевых клеток к репарации радиационных повреждений, а также мутации гена онкосупрессора p53 [9-11]. Продукт экспрессии гена p53 считается молекулярно-биологическим маркером, позволяющим прогнозировать радиочувствительность злокачественных новообразований. Согласно данным литературы, мутантный белок p53 обладает высокой стабильностью и может накапливаться в ядрах клеток, однако теряет способность контролировать клеточный цикл и запускать механизм апоптоза для элиминации дефектных клеток [12]. Полагают, что радиорезистентность опухолей с *mt* p53 обусловлена неспособностью излучений с низкой ЛПЭ индуцировать p53-зависимый апоптоз. Более чем у 50% онкологических больных в неоплазиях обнаруживается *mt* p53 [11]. Тем не менее, сведения о его вовлечении в эффективность ПТ опухолей практически отсутствуют.

Целью данного исследования являлось изучение эффективности воздействия γ - и протонного излучений на пролиферативную активность неопластических клеток, их гибель путём апоптоза и васкуляризацию радиорезистентной соединительнотканной опухоли, перевиваемой крысам, с ранее верифицированным нами мутантным онкопротеином p53 [12].

Материалы и методы

Исследования выполнены в соответствии с международными рекомендациями по проведению работ на лабораторных животных, изложенных в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1987) на самцах беспородных белых крыс массой тела 150-170 г с привитой под кожу голени саркомой М-1 [12]. Крыс-опухоленосителей распределяли на группы – контрольную (ложнооблучённые особи) и две опытные. Опухолевые узлы животных 1-й опытной группы подвергали воздействию γ -квантов ^{60}Co в дозе 32 Гр (0,67 Гр/мин). Опухоли особей 2-й группы облучали протонами в дозе 32 Гр на пучке терапевтического комплекса «Прометеус» (Обнинск). План облучения подготавливался встроенной системой планирования протонного комплекса. Модуля-

ция облучения по глубине обеспечивалась активным переключением энергии сканирующих пучков протонов синхротрона в диапазоне от 75 до 93,7 МэВ. С учётом точек поперечного сканирования всего в составленном плане было 407 пучков. Для верификации подведённой дозы в исследуемой геометрии облучения использовалась ионизационная камера PTW TM30010 с дозиметром PTW Unidos Weblin (Германия). Для контроля равномерности облучения в латеральном сечении использовали радиохромную плёнку Ashland Gafchromic EBT3 (США). Результаты верификации показали хорошую равномерность поля воздействия протонами в пределах $\pm 5\%$.

Облучение начинали при достижении опухолевыми узлами объёмов 1,2-2,4 см³ на 12 сутки после прививки саркомы. Для оценки эффективности лучевых воздействий использовали показатель коэффициента роста опухолей: $KPO = (V_i - V_0)/V_0$, где V_i – объём опухоли (см³) на i сутки от прививки саркомы М-1, а V_0 – объём опухоли в день облучения» [13].

Для изучения морфофункциональных показателей саркомы по 5 особей из каждой группы выводили из опытов в период статистически значимого снижения KPO при действии γ -квантов и протонов через 6 суток после облучения. Опухолевые узлы выделяли под тиопенталовым наркозом. Тканевые пластинки саркомы М-1 фиксировали в жидкости Буэна и после стандартного обезживания заливали в парафиновую среду «Гистомикс» (БиоВитрум).

Гистологию саркомы М-1 изучали на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Иммуногистохимические (ИГХ) исследования выполняли методом биотин-стрептавидин/экстравидин-пероксидазного комплекса с применением кроличьих антител к белку p53 (FL393, «Santa Cruz», 1:50), мышинных антител к PCNA (клон PC10, «Thermo Fisher scientific», 1:100), конъюгированных с биотином, и кроличьих антител к маркеру эндотелия – PECAM-1 (CD31, М-20-R, «Santa Cruz», 1:100). Для иммуновизуализации онкопротеина p53 применяли набор для выявления кроличьих первичных антител (EnVision+System-HRP, K4011, «Dako»). При этом субстратную пероксидазу проявляли аминоктилкарбазолом (АЕС+, «DAKO») с докрасиванием ядер клеток гематоксилином и заключением гистологических препаратов в водорастворимую среду (Faramount, «DAKO»).

Для выявления биотинилированных первичных антител к PCNA на срезы наносили экстравидин-пероксидазный комплекс («Sigma», 1:400); для антител к CD31 применяли набор (EnVision+System-HRP, K4011, «Dako») согласно прилагаемым инструкциям с проявлением субстратной пероксидазы диаминобензидином (Liquid DAB+, «Dako»).

Объёмное содержание паренхимы опухолей ($V_{по}$) как отношение площади паренхимы без зон некроза/деструкции ткани при окрашивании срезов гематоксилином и эозином к площади среза опухолевого узла, объёмную долю паренхимы с PCNA-положительной реакцией ядер опухолевых клеток (ρ_{PCNA} , отн. ед.) по отношению суммарной площади PCNA-положительной паренхимы к площади среза опухоли и количественную плотность сосудов ($N_{сос}$) по числу сечений их профилей на 1 мм² в тестовых полях общей площадью не менее 10 мм² в периферических зонах паренхимы опухоли определяли методом сегментации изображений, используя порог интенсивности в полуавтоматическом режиме, и рассчитывали с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений с применением лицензионного программного обеспечения Leica Application Suite.

Гистологические препараты изучали под микроскопом Leica DM 1000 с микрофотосъёмкой на цифровую камеру Leica ICC50 HD. Количественное содержание опухолевых клеток (клеточность, $N_{ок}$) по числу сечений их профилей на 1 мм² площади среза, индексы PCNA (I_{PCNA} , %),

нормальных и патологических митозов ($I_{\text{нмит}}$ и $I_{\text{пмит}}$ соответственно, %), и апоптоза ($I_{\text{ап}}$, %) опухолевых клеток в паренхиме определяли в тестовых полях общей площадью не менее $0,5 \text{ мм}^2$ при иммерсионном увеличении микроскопа. Фракцию клеток с положительной реакцией их ядер на PCNA рассчитывали по формуле « $\Phi_{\text{PCNA}} = \rho_{\text{PCNA}} \times I_{\text{PCNA}} \times K_N$, где $K_N = \frac{N_{\text{ок}}}{N_{\text{ок}}}$ в опыте/ $N_{\text{ок}}$ в контроле» [14].

Коэффициент эффективности ($K_{\text{эфф}}$) действия γ -квантов и протонов на саркому определяли путём нормирования показателя на 1 Гр подведённой дозы: « $K_{\text{эфф}} = \Delta/D$, где $\Delta = (M_{\text{конт}} - M_{\text{оп}})$ – разница в значении среднего показателя между контрольной ($M_{\text{конт}}$) и опытной группой ($M_{\text{оп}}$), а D – суммарная подведённая доза, Гр» [12]. ОБЭ сканирующих пучков протонов определяли по отношению нормированных $K_{\text{эфф}}$ для протонов и γ -излучения.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США). Непараметрический U-критерий Манна-Уитни использовали для оценки уровня значимости межгрупповых различий полученных показателей. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На 6 сутки от начала экспериментов КРО в контроле составил $2,60 \pm 0,41$ (табл. 1). Микроскопически паренхима саркомы М-1 представлена солидными тяжами неправильной формы с очагами некроза в центральных зонах опухолевых узлов (рис. 1а). В участках солидного строения опухолевые клетки с крупными ядрами преимущественно овальной формы плотно упакованы (рис. 1б). В полях зрения просматривались многочисленные митозы, в том числе и патологические, и отдельные клетки на разных стадиях апоптотической гибели.

Таблица 1

Количественные морфологические характеристики исследованных показателей саркомы М-1 в контроле, через 6 суток после воздействия γ -квантов ^{60}Co и протонов в дозах 32 Гр ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Действие γ -излучения	Действие протонов
Коэффициент роста опухолей	$2,60 \pm 0,41$	$-0,17 \pm 0,09^*$	$-0,30 \pm 0,08^*$
Объёмное содержание паренхимы саркомы при окрашивании гематоксилином и эозином, %	$78,3 \pm 4,7$	$96,1 \pm 0,38^*$	$96,8 \pm 0,8^*$
Количественная плотность сосудов в краевой зоне роста опухолей на 1 мм^2 площади среза	$120,3 \pm 5,8$	$50,7 \pm 3,0^*$	$51,8 \pm 2,2^*$
Клеточность паренхимы на 1 мм^2 площади среза	5144 ± 118	$1891 \pm 95^*$	$1523 \pm 175^*$
Индекс нормальных митозов, %	$1,58 \pm 0,31$	$0,43 \pm 0,12^*$	$0,29 \pm 0,14^*$
Индекс патологических митозов, %	$0,49 \pm 0,06$	$3,50 \pm 0,23^*$	$4,63 \pm 0,42^{**}$
Индекс апоптоза, %	$0,27 \pm 0,09$	$3,16 \pm 0,29^*$	$4,90 \pm 0,46^{**}$
Объёмная доля PCNA-положительной паренхимы, отн. ед.	$0,62 \pm 0,05$	$0,78 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,07$
Индекс PCNA, %	$48,0 \pm 2,8$	$35,8 \pm 0,9^*$	$28,6 \pm 3,1^*$
Фракция PCNA-положительных опухолевых клеток в паренхиме, %	$29,9 \pm 2,3$	$10,3 \pm 0,9^*$	$4,9 \pm 0,7^{**}$

Примечания: $^*p < 0,05$ – относительно контроля; $^{**}p < 0,05$ – относительно действия γ -излучения.

От нормальных тканей опухоли отделены соединительнотканной псевдокапсулой, инфильтрированной лимфоцитами и нейтрофилами. Из перитуморальной зоны от расширенных полнокровных венул ответвлялись капиллярные петли, врастающие в саркому. Характерной особенностью гистоангиоархитектоники саркомы М-1 являлась неоднородность распределения сосудов с более выраженной васкуляризацией периферических участков, прилегающих к здоровым тканям. Типичная картина локализации сосудов в зоне экспансивного роста опухолей показана на рис. 1в. В более отдалённых от периферии участках просматривались единичные

микрососуды и морфологические признаки гипоксии паренхимы с дистрофическими изменениями и цитолизом отдельных опухолевых клеток.

Жизнеспособная паренхима опухолей контурировалась при иммуноокрашивании на PCNA с отчётливым градиентом снижения реакции на этот маркер пролиферации от периферии к центру опухолей (рис. 1а). Интенсивно пролиферирующие неопластические клетки располагались преимущественно по периферии саркомы М-1 в области перитуморального ангиогенеза (рис. 1д). Мутантный белок р53 определялся в большинстве ядер опухолевых клеток (рис. 1е).

По данным количественного анализа (табл. 1), у особей контрольной группы плотность сосудов в краевой зоне экспансивного роста опухолей составила $120,3 \pm 5,8$, клеточность паренхимы – 5144 ± 118 на 1 мм^2 , индексы нормальных и патологических митозов были равны $1,58 \pm 0,31$ и $0,49 \pm 0,06\%$ соответственно, а $I_{AP} - 0,27 \pm 0,09\%$. Расчётное значение фракции пролиферирующих опухолевых клеток по PCNA соответствовало $29,9 \pm 2,3\%$.

Рис. 1. Морфология саркомы М-1 в контроле. а, б – окрашивание гематоксилином и эозином; в – иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31; г, д – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; е – иммуноокрашивание на онкопротеин р53 (аминоэтилкарбазол, ядра клеток докрашены гематоксилином). Звёздочками отмечены зоны спонтанного некроза. б, д, е $\times 250$, в $\times 125$.

После воздействия γ -излучения **KPO** снизился до $-0,17 \pm 0,09$. Снижение скорости роста новообразований сопровождалось уменьшением размеров очагов спонтанного некроза с увеличением V_{no} до $96,1 \pm 0,38\%$. При гистологическом изучении опухолей обращало на себя внимание, что в результате снижения клеточности зоны максимального лучевого повреждения определялись более светлым окрашиванием паренхимы и располагались в виде полос шириной от 1 до 2 мм по периферии опухолей (рис. 2а), наиболее васкуляризированной и, следовательно, относительно хорошо оксигенированной у крыс контрольной группы. В полях зрения выявлялись многоядерные клетки, аберрантные митозы и фигуры апоптоза (рис. 2б). В краевой зоне саркомы регистрировалось как снижение содержания сосудов (рис. 2в), так и интенсивности иммуноокрашивания паренхимы на маркер пролиферации (рис. 2г). В участках солидного строения заметно уменьшалось количество пролиферирующих клеток (рис. 2е) с реакцией их ядер на белок p53 (рис. 2е).

Рис. 2. Морфология саркомы М-1 на 6 сутки после воздействия γ -излучения в дозе 32 Гр. а, б – окрашивание гематоксилином и эозином; в – иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31; г, д – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; е – иммуноокрашивание на онкопротеин p53 (аминоэтилкарбазол, ядра клеток докрашены гематоксилином). Звёздочками отмечены зоны максимального лучевого поражения опухолевых клеток; белые стрелки – патологические митозы; чёрные стрелки – апоптоз. б, д, е $\times 250$, в $\times 125$.

Согласно результатам морфометрии после воздействия γ -квантов количественная плотность сосудов, клеточность, I_{HMIT} и Φ_{PCNA} снизились относительно контроля в 2,4, 2,7, 3,7 и 2,9 раза, а I_{PMIT} и I_{AP} статистически значимо увеличились в 7,1 и 11,7 раз соответственно.

После облучения протонами **КРО** снизился до $-0,30 \pm 0,08$, клеточность паренхимы уменьшилась почти на 20% относительно 1-й опытной группы ($p > 0,05$), а зоны максимального повреждения опухолей визуализировались не только в краевой зоне, но и в центральных отделах опухолевых узлов (рис. 3а, г). В полях солидного строения отмечалось увеличение aberrantных митозов в виде многополюсных и асимметричных с рассеиванием в цитоплазме фрагментов хромосом, свидетельствующих о необратимом повреждении опухолевых клеток путём их ухода в митотическую катастрофу, и клеток, погибающих путём апоптоза (рис. 3б). Визуально в зонах роста саркомы снижался ангиогенез (рис. 3в), а в сохранившихся участках паренхимы заметно уменьшалось содержание пролиферирующих клеток (рис. 3д) с мутантным онкопротеином p53 (рис. 3е).

Рис. 3. Морфология саркомы М-1 на 6 сутки после облучения протонами в дозе 32 Гр. а, б – окрашивание гематоксилином и эозином; в – иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31; г, д – иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; е – иммуноокрашивание на онкопротеин p53 (аминоэтилкарбазол, ядра клеток докрашены гематоксилином). Звёздочками отмечены зоны максимального лучевого поражения опухолевых клеток; белые стрелки – патологические митозы; чёрные стрелки – апоптоз. б, д, е $\times 250$, в $\times 125$.

Согласно результатам морфометрии, $N_{\text{сос}}$ в периферических зонах опухолей снизилось относительно контроля в 2,3 раза. При этом показатели снижения уровня васкуляризации неоплазий у животных 2-й опытной группы варьировали в диапазоне данных, полученных при воздействии γ -квантов ^{60}Co . $I_{\text{пмит}}$ и $I_{\text{ап}}$ увеличились статистически значимо в сравнении с этими показателями при действии γ -излучения до $4,63 \pm 0,42$ и $4,90 \pm 0,46\%$. Расчётное содержание фракции PCNA-положительных опухолевых клеток уменьшилось до $4,9 \pm 0,7\%$ при $p < 0,01$ относительно действия γ -излучения.

Сравнительный анализ $K_{\text{эфф}}$ γ - и протонного излучений показал, что расчётные значения ОБЭ протонов по снижению количественной плотности опухолевых клеток, их пролиферативной активности, увеличению индексов патологических митозов и индуцированного апоптоза составили 1,1; 1,3; 1,4 и 1,6 соответственно. На наш взгляд, есть основания полагать, что увеличение ОБЭ протонов всего лишь на 10% по снижению клеточности на 6 сутки после облучения могло быть обусловлено недостаточным удалением погибших клеток из зон лучевого повреждения на данный срок исследования.

Данные литературы, обобщённые в обзорах [6, 8] свидетельствуют, что биологическая эффективность протонов по ряду показателей, включающих уровень повреждения хромосом, снижение пролиферативного потенциала клеток и их индуцированную гибель, зависит от энергии протонов и их ЛПЭ.

По существующим представлениям, ионизирующее излучение инициирует различные формы гибели клеток, такие как апоптоз, некроз, некроптоз, аутофагия, митотическая катастрофа (гибель клеток в результате аномалий митоза) и ускоренное старение облучённых клеток с перманентной потерей их репопуляционной способности [10, 11, 15]. Среди них основными механизмами и формами радиационно-индуцированной гибели опухолевых клеток при лучевой терапии считают митотическую катастрофу и апоптоз. Гибель клеток после аномального митоза, вызванного аберрантным расхождением хромосом, может произойти в первом или последующих делениях после облучения. Многоядерные клетки с функциональным геном p53 гибнут через BAX-зависимый митохондриальный путь апоптоза во время следующей фазы G1 [11]. Однако опухолевые клетки с мутантным белком p53 могут проходить несколько клеточных циклов и приобретать все большее количество хромосомных aberrаций до их гибели путём отсроченного апоптоза или некроза [16].

Наши данные о более высокой эффективности протонного излучения по индукции апоптоза опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с γ -квантами ^{60}Co при одинаковых дозах соответствуют результатам других авторов, полученным *in vitro* при облучении протонами культивируемых линий опухолевых клеток человека [17-20]. Заслуживают особого внимания данные, представленные в работе R.A. Mitteer et al. [21], согласно которым протоны по сравнению с фотонным излучением оказывают более выраженное действие на генотоксическое повреждение ДНК и индуцированную апоптотическую гибель опухолевых стволовых клеток мультиформной глиобластомы. Авторы полагают, что цитотоксичность протонной лучевой терапии опосредована генерацией большого количества активных форм кислорода в области высокой плотности ионизации в дистальной зоне распределённого пика Брэгга.

Необходимо отметить, что в отчёте об основных результатах международного экспертного семинара «Радиобиология протонной терапии», который состоялся в ноябре 2016 г. в Дрездене, подчёркивается, что ключевыми для достижения полного потенциала протонной лучевой

терапии являются: корректное определение ОБЭ протонов, проверка их биологических эффектов в клинических испытаниях, взаимодействие протонной радиобиологии и радиационной физики при планировании лечения, а также стратификация пациентов на основе экспрессии биомаркеров [22].

Заключение

Результаты проведённого нами исследования показали, что при однократном облучении положительной по мутантному гену p53 саркомы М-1 с подведением равных доз γ -квантов ^{60}Co и протонного излучения протоны сканирующего пучка оказывают более выраженную противоопухолевую эффективность по критериям индукции патологических митозов, апоптотической гибели опухолевых клеток и снижения их пролиферативной активности.

Расчётные значения ОБЭ протонов по снижению фракции PCNA-положительных опухолевых клеток, увеличению содержания патологических митозов и индуцированному апоптозу составили 1,3; 1,4 и 1,6 соответственно.

Данная работа выполнена на базе МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, на протяжении многих лет успешно сочетающего в своей работе экспериментальные исследования и их клиническое применение [23-25].

Литература

1. **Mohan R., Grosshans D.** Proton therapy – present and future //Adv. Drug Deliv. Rev. 2017. V. 109. P. 26-44.
2. **Воробьев Н.А., Михайлов А.В., Смирнова Е.В., Гуцало Ю.В., Мартынова Н.И.** Возможности протонной терапии. Клинические аспекты //Русский медицинский журнал. 2017. № 16. С. 1175-1180.
3. **Забелин М.В., Климанов В.А., Галютдинова Ж.Ж., Самойлов А.С., Лебедев А.О., Шелухина Е.В.** Протонная лучевая терапия: возможности клинического применения и перспективы исследования //Исследования и практика в медицине. 2018. Т. 5, № 1. С. 82-95.
4. **Бушманов А.Ю., Шейно И.Н., Липенгольц А.А., Соловьев А.Н., Корякин С.Н.** Перспективы применения комбинированных технологий в протонной терапии злокачественных новообразований //Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64, № 3. С. 11-18.
5. **Wedenberg M., Lind B.K., Hårdemark B.** A model for the relative biological effectiveness of protons: the tissue specific parameter α/β of photons is a predictor for the sensitivity to LET changes //Acta Oncol. 2013. V. 52, N 3. P. 580-588.
6. **Paganetti H.** Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. Variations as a function of biological endpoint, dose, and linear energy transfer //Phys. Med. Biol. 2014. V. 59, N 22. P. R419-R472.
7. **Tommasino F., Durante M.** Proton radiobiology //Cancers (Basel). 2015. V. 7, N 1. P. 353-381.
8. **Иванов А.А., Бычкова Т.М., Никитенко О.В., Ушаков И.Б.** Радиобиологические эффекты протонов //Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64, № 3. С. 19-31.
9. **Baskar R., Dai J., Wenlong N., Yeo R., Yeoh K.W.** Biological response of cancer cells to radiation treatment //Front. Mol. Biosci. 2014. V. 1, N 24. P. 1-9. DOI: 10.3389/fmolb.2014.00024.
10. **Kim B.M., Hong Y., Lee S., Liu P., Lim J.H., Lee Y.H., Lee T.H., Chang K.T., Hong Y.** Therapeutic implications for overcoming radiation resistance in cancer therapy //Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16, N 11. P. 26880-26913.
11. **Maier P., Hartmann L., Wenz F., Herskind C.** Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization //Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17, N 1. P. 102. DOI: 10.3390/ijms17010102.
12. **Южаков В.В., Севаньяева Л.Е., Ульяненко С.Е., Яковлева Н.Д., Кузнецова М.Н., Цыганова М.Г., Фомина Н.К., Ингель И.Э., Лычагин А.А.** Эффективность фракционированного воздействия γ -излучения и быстрых нейтронов на саркому М-1 //Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53, № 3. С. 267-279.
13. **Южаков В.В., Романко Ю.С., Каплан М.А., Галкин В.Н., Мажуга А.Г., Грин М.А., Бурмистрова Н.В., Фомина Н.К., Бандурко Л.Н., Севаньяева Л.Е., Яковлева Н.Д., Ингель И.Э., Мозеров С.А., Старовойтова А.В.** Действие фотодинамической терапии с производным бактериохлорофилла а на рост и функциональную морфологию саркомы М-1 крыс //Альманах клинической медицины. 2017. Т. 45, № 4. С. 333-347.
14. **Севаньяева Л.Е., Южаков В.В., Конопляников А.Г., Романко Ю.С., Бандурко Л.Н., Фомина Н.К., Ингель И.Э., Конопляников М.А., Яковлева Н.Д., Цыганова М.Г.** Радиосенсибилизирующее действие мезенхимальных стволовых клеток человека при локальном воздействии γ -излучения на саркому М-1 крыс //Радиация и риск. 2017. Т. 26, № 3. С. 100-115.
15. **Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.W.** Cancer and radiation therapy: current advances and future directions //Int. J. Med. Sci. 2012. V. 9, N 3. P. 193-199.

16. **Vitale I., Galluzzi L., Castedo M., Kroemer G.** Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability //Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2011. V. 12, N 6. P. 385-392.
17. **Di Pietro C., Piro S., Tabbi G., Ragusa M., Di Pietro V., Zimmiti V., Cuda F., Anello M., Consoli U., Salinaro E.T., Caruso M., Vancheri C., Crimi N., Sabini M.G., Cirrone G.A., Raffaele .L, Privitera G., Pulvirenti A., Giugno R., Ferro A., Cuttone G., Lo Nigro S., Purrello R., Purrello F., Purrello M.** Cellular and molecular effects of protons: apoptosis induction and potential implications for cancer therapy //Apoptosis. 2006. V. 11, N 1. P. 57-66.
18. **Ristic-Fira A.M., Todorovic D.V., Koricanac L.B., Petrovic I.M., Valastro L.M., Cirrone P.G., Raffaele L., Cuttone G.** Response of a human melanoma cell line to low and high ionizing radiation //Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007. V. 1095. P. 165-174.
19. **Lee K.B., Lee J.S., Park J.W., Huh T.L., Lee Y.M.** Low energy proton beam induces tumor cell apoptosis through reactive oxygen species and activation of caspases //Exp. Mol. Med. 2008. V. 40, N 1. P. 118-129.
20. **Gerelchuluun A., Hong Z., Sun L., Suzuki K., Terunuma T., Yasuoka K., Sakae T., Moritake T., Tsuboi K.** Induction of *in situ* DNA double-strand breaks and apoptosis by 200 MeV protons and 10 MV X-rays in human tumour cell lines //Int. J. Radiat. Biol. 2011. V. 87, N 1. P. 57-70.
21. **Mitteer R.A., Wang Y., Shah J., Gordon S., Fager M., Butter P.-P., Jun Kim H., Guardiola-Salmeron C., Carabe-Fernandez A., Fan Y.** Proton beam radiation induces DNA damage and cell apoptosis in glioma stem cells through reactive oxygen species //Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 13961-13973.
22. **Lühr A., von Neubeck C., Pawelke J., Seidlitz A., Peitzsch C., Bentzen S.M., Bortfeld T., Debus J., Deutsch E., Langendijk J.A., Loeffler J.S., Mohan R., Scholz M., Sørensen B.S., Weber D.C., Baumann M., Krause M.** "Radiobiology of Proton Therapy": results of an international expert workshop //Radiother. Oncol. 2018. V. 128, N 1. P. 56-67.
23. **Каприн А.Д., Галкин В.Н., Жаворонков Л.П., Иванов В.К., Иванов С.А., Романко Ю.С.** Синтез фундаментальных и прикладных исследований – основа обеспечения высокого уровня научных результатов и внедрения их в медицинскую практику //Радиация и риск. 2017. Т. 26, № 2. С. 26-40.
24. **Каприн А.Д., Мардынский Ю.С., Смирнов В.П., Иванов С.А., Костин А.А., Полихов С.А., Решетов И.В., Фатьянова А.С., Денисенко М.В., Эпатова Т.В., Коренев С.В., Терещенко А.В., Филоненко Е.В., Гафаров М.М., Романко Ю.С.** К истории развития лучевой терапии (часть I) //Biomedical Photonics. 2019. Т. 8, № 1. С. 52-62. [Электронный ресурс]. URL: <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2019-8-1-52-62> (дата обращения 22.01.2020).
25. **Каприн А.Д., Смирнов В.П., Иванов С.А., Полихов С.А., Решетов И.В., Фатьянова А.С., Бабаева Ю.В., Денисенко М.В., Семенова Н.М., Коренев С.В., Терещенко А.В., Филоненко Е.В., Южаков В.В., Корякин С.Н., Сухова Т.Е., Гафаров М.М., Огданская К.В., Романко Ю.С.** К 115-летию отечественной радиологии. История развития лучевой терапии: лучевая диагностика в МРНЦ им. А.Ф. Цыба //Biomedical Photonics. 2019. Т. 8, № 2. С. 47-50.

Effect of γ -radiation and scanning proton beam on the morphofunctional characteristics of rat sarcoma M-1

Yuzhakov V.V., Korchagina K.S., Fomina N.K., Koryakin S.N., Solovov A.N., Ingel I.E., Koretskaya A.E., Sevankaeva L.E., Yakovleva N.D., Tsyganova M.G.

A. Tsyb MRRC, Obninsk

Today proton therapy (PT) is the most advanced radiation therapy. Due to precise delivery of charged particles to a target, proton therapy destroys cancer cells, the risk of damaging surrounding tissues is very low. At present, physical properties of proton beams are understood, however their biological effectiveness needs further study. Effectiveness of radiotherapy depends on radiosensitivity of cancer cells. There are several factors that can determine radiosensitivity of tumor cells. One of them, mutant form of tumor-suppressor p53-gene (mt p53), makes possible determining tumor radiosensitivity, predicts the development and outcome of a disease. The mutant p53-gene occurs in tumor cells of more than 50% of cancer patients. However, there is no much information on its role in sensitivity of tumor cells to PT. The paper presents results of the study of effects of photon radiation with ^{60}Co and proton beams on morphology and function of mt p53 positive sarcoma M-1 cells. Methods of study included: p53 immune-histochemical staining, proliferating cells nuclear antigen (PCNA), endothelium marker CD31, and determining mitotic and apoptotic indexes. The cells were exposed to gamma-radiation or to proton beams, radiation doses in the tests was the same. The study findings are the following: effectiveness of γ -positive therapy estimated by the level of mitotic and of repopulating activity of irradiated neoplastic cells, induction of abnormal mitotic figures and apoptosis differs from the effectiveness of proton therapy; antitumor effect of proton therapy is more pronounced as compared with the effect of gamma-therapy. Relative biological effectiveness, RBE, of protons estimated by reduction of PCNA-positive fraction of tumor cells, increase in the number of abnormal mitotic figures and induced apoptosis was 1.3; 1.4 and 1.6 respectively.

Keywords: γ -radiation, protons, RBE, antitumor efficiency, M-1 sarcoma, mutant p53 gene, abnormal mitoses, apoptosis, angiogenesis, immunohistochemistry, PCNA, CD31.

References

1. Mohan R., Grosshans D. Proton therapy – present and future. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2017, vol. 109, pp. 26-44.
2. Vorobiev N.A., Mikhailov A.V., Smirnova E.V. Gutsalo Yu.V. Martynova N.I. Possibilities of proton therapy. Clinical aspects. *Russkiy meditsinskiy zhurnal – Russian Medical Journal*, 2017, no. 16, pp. 1175-1180. (In Russian).
3. Zabelin M.V., Klimanov V.A., Galyautdinova J.J., Samoilov A.S., Lebedev A.O., Shelyhina E.V. Proton radiation therapy: clinical application opportunities and research prospects. *Issledovaniya i praktika v meditsine – Research'n Practical Medicine Journal*, 2018, vol. 5, no 1, pp. 82-95. (In Russian).
4. Bushmanov A.Yu., Sheino I.N., Lipengolts A.A., Solovov A.N., Koryakin S.N. Prospects of proton therapy combined technologies in the treatment of cancer. *Meditsinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost' – Medical Radiology and Radiation Safety*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 11-18. (In Russian).
5. Wedenberg M., Lind B.K., Hårdemark B. A model for the relative biological effectiveness of protons: the tissue specific parameter α/β of photons is a predictor for the sensitivity to LET changes. *Acta Oncol.*, 2013, vol. 52, no. 3, pp. 580-588.
6. Paganetti H. Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. Variations as a function of biological endpoint, dose, and linear energy transfer. *Phys. Med. Biol.*, 2014, vol. 59, no. 22, pp. R419-R472.
7. Tommasino F., Durante M. Proton radiobiology. *Cancers (Basel)*, 2015, vol. 7, no. 1. pp. 353-381.

Yuzhakov V.V.* – Head of Lab, C. Sc., Med.; Korchagina K.S. – Researcher; Fomina N.K. – Sen. Researcher, C. Sc., Biol.; Koryakin S.N. – Head of Lab., C. Sc., Biol.; Solovov A.N. – Head of Lab., C. Sc., Phys.-Math.; Ingel I.E. – Sen. Researcher, C. Sc., Biol.; Koretskaya A.E. – Res. Assistant; Sevankaeva L.E. – Sen. Researcher; Yakovleva N.D. – Lead. Researcher, C. Sc., Biol.; Tsyganova M.G. – Researcher. A. Tsyb MRRC.

*Contacts: 4 Korolyov str., Obninsk, Kaluga region, Russia, 249035. Tel.: +7 (903) 635 79 71; e-mail: yuzh_vad@mail.ru.

8. **Ivanov A.A., Bichkova T.M., Nikitenko O.V., Ushakov I.B.** Radiobiological proton effects. *Meditsinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost' – Medical Radiology and Radiation Safety*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 19-31. (In Russian).
9. **Baskar R., Dai J., Wenlong N., Yeo R., Yeoh K.W.** Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front. Mol. Biosci.*, 2014, vol. 1, no. 24, pp. 1-9. DOI: 10.3389/fmolb.2014.00024.
10. **Kim B.M., Hong Y., Lee S., Liu P., Lim J.H., Lee Y.H., Lee T.H., Chang K.T., Hong Y.** Therapeutic implications for overcoming radiation resistance in cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, vol. 16, no. 11, pp. 26880-26913.
11. **Maier P., Hartmann L., Wenz F., Herskind C.** Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, no. 1, p. 102. DOI: 10.3390/ijms17010102.
12. **Iuzhakov V.V., Sevan'kaeva L.E., Ul'ianenko S.E., Iakovleva N.D., Kuznetsova M.N., Tsyganova M.G., Fomina N.K., Ingel' I.E., Lychagin A.A.** The effectiveness of fractionated exposure of sarcoma M-1 to gamma-radiation and fast neutrons. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2013, vol. 53, no. 3, pp. 267-279. (In Russian).
13. **Yuzhakov V.V., Romanko Y.S., Kaplan M.A., Galkin V.N., Majouga A.G., Grin M.A., Burmistrova N.V., Fomina N.K., Bandurko L.N., Sevankaeva L.E., Yakovleva N.D., Ingel I.E., Mozerov S.A., Starovoytova A.V.** Effect of photodynamic therapy with the bacteriochlorophyll a derivative on growth and functional morphology of rat sarcoma M-1. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny – Almanac of Clinical Medicine*, 2017, vol. 45, no. 4, pp. 333-347. (In Russian).
14. **Sevankaeva L.E., Yuzhakov V.V., Konoplyannikov A.G., Romanko Yu.S., Bandurko L.N., Fomina N.K., Ingel I.E., Konoplyannikov M.A., Yakovleva N.D., Tsyganova M.G.** Radiosensitising effect of human mesenchymal stem cells on sarcoma M-1 under local gamma-irradiation. *Radiatsiya i risk – Radiation and Risk*, 2017, vol. 26, no. 3, pp. 100-115. (In Russian).
15. **Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.W.** Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int. J. Med. Sci.*, 2012, vol. 9, no. 3, pp. 193-199.
16. **Vitale I., Galluzzi L., Castedo M., Kroemer G.** Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2011, vol. 12, no. 6, pp. 385-392.
17. **Di Pietro C., Piro S., Tabbi G., Ragusa M., Di Pietro V., Zimmiti V., Cuda F., Anello M., Consoli U., Salinaro E.T., Caruso M., Vancheri C., Crimi N., Sabini M.G., Cirrone G.A., Raffaele L., Privitera G., Pulvirenti A., Giugno R., Ferro A., Cuttone G., Lo Nigro S., Purrello R., Purrello F., Purrello M.** Cellular and molecular effects of protons: apoptosis induction and potential implications for cancer therapy. *Apoptosis*, 2006, vol. 11, no. 1, pp. 57-66.
18. **Ristic-Fira A.M., Todorovic D.V., Koricanac L.B., Petrovic I.M., Valastro L.M., Cirrone P.G., Raffaele L., Cuttone G.** Response of a human melanoma cell line to low and high ionizing radiation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, vol. 1095, pp. 165-174.
19. **Lee K.B., Lee J.S., Park J.W., Huh T.L., Lee Y.M.** Low energy proton beam induces tumor cell apoptosis through reactive oxygen species and activation of caspases. *Exp. Mol. Med.*, 2008, vol. 40, no. 1, pp. 118-129.
20. **Gerelchuluun A., Hong Z., Sun L., Suzuki K., Terunuma T., Yasuoka K., Sakae T., Moritake T., Tsuboi K.** Induction of in situ DNA double-strand breaks and apoptosis by 200 MeV protons and 10 MV X-rays in human tumour cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2011, vol. 87, no. 1, pp. 57-70.
21. **Mitteer R.A., Wang Y., Shah J., Gordon S., Fager M., Butter P.-P., Jun Kim H., Guardiola-Salmeron C., Carabe-Fernandez A., Fan Y.** Proton beam radiation induces DNA damage and cell apoptosis in glioma stem cells through reactive oxygen species. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, pp. 13961-13973.
22. **Lühr A., von Neubeck C., Pawelke J., Seidlitz A., Peitzsch C., Bentzen S.M., Bortfeld T., Debus J., Deutsch E., Langendijk J.A., Loeffler J.S., Mohan R., Scholz M., Sørensen B.S., Weber D.C., Baumann M., Krause M.** "Radiobiology of Proton Therapy": results of an international expert workshop. *Radiother. Oncol.*, 2018, vol. 128, no. 1, pp. 56-67.

23. **Kaprin A.D., Galkin V.N., Zhavoronkov L.P., Ivanov V.K., Ivanov S.A., Romanko Yu.S.** Synthesis of basic and applied research is the basis of obtaining high-quality findings and translating them into clinical practice. *Radiatsiya i risk – Radiation and Risk*, 2017, vol. 26, no. 2, pp. 26-40. (In Russian).
24. **Kaprin A.D., Mardinskiy Y.S., Smirnov V.P., Ivanov S.A., Kostin A.A., Polikhov S.A., Reshetov I.V., Fatianova A.S., Denisenko M.V., Epatova T.V., Korenev S.V., Tereshchenko A.V., Filonenko E.V., Gafarov M.M., Romanko Yu.S.** The history of radiation therapy (part I). *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 52-62. Available at: <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2019-8-1-52-62> (Accessed 22.01.2020). (In Russian).
25. **Kaprin A.D., Smirnov V.P., Ivanov S.A., Polihov S.A., Reshetov I.V., Fatyanova A.C., Babaeva Yu.V., Denisenko M.V., Semenova N.M., Korenev S.V., Tereshchenko A.V., Filonenko E.V., Yuzhakov V.V., Koryakin S.N., Sukhova T.E., Gafarov M.M., Ogdanskaya K.V., Romanko Yu.S.** To the 115th anniversary of Russian radiology. The history of the development of radiation therapy: radiation diagnosis in the A. Tsyb MRRC. *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 2, pp.47-50. (In Russian).