

Отделение физиологических наук РАН
Радиобиологическое общество РАН
Национальный медицинский исследовательский
центр радиологии Минздрава РФ
Объединенный институт ядерных исследований



«РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ»

Материалы 3-й Российской конференции с международным участием
Дубна, 17-18 октября 2019 г

Организаторы конференции:
Научный совет РАН по радиобиологии
Лаборатория радиационной биологии ОИЯИ
Медицинский радиологический центр им.А.Ф.Цыба
ООО «Специальная и Медицинская Техника»

Оргкомитет конференции

Председатели:

Каприн А.Д., академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ

Красавин Е.А., чл.-корр.РАН, директор ЛРБ ОИЯИ, председатель Научного совета РАН по радиобиологии

Отв.секретарь **Найдич В.И.**, к.х.н., Научный совет РАН по радиобиологии

Члены Оргкомитета:

Борейко А.В., д.б.н., ЛРБ ОИЯИ

Гребенюк А.Н., д.м.н., проф., ООО «Специальная и медицинская техника»

Гулидов И.А., д.м.н., проф., МРНЦ им.А.Ф.Цыба

Жаворонков Л.П., д.м.н., МРНЦ им.А.Ф.Цыба

Замулаева И.А., д.б.н., проф., МРНЦ им.А.Ф.Цыба

Иванов С.А., д.м.н., проф. РАН, директор МРНЦ им.А.Ф.Цыба

Кошлань И.В., к.б.н., ЛРБ ОИЯИ

Молоканов А.Г., к.т.н., ЛЯП ОИЯИ

Снигирева Г.П., д.б.н., РНЦРР Минздрава РФ

Черняев А.П., д.ф.-м.н., проф., МГУ им.М.В.Ломоносова

Ширков Г.Д., чл.-корр.РАН, ОИЯИ

Хмелевский Е.В. - д.м.н., проф., ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава РФ

В сборнике представлены материалы 3-й Российской конференции с международным участием «**Радиобиологические основы лучевой терапии**» (Дубна, 17-18 октября 2019 г.). На конференции обсуждены современные результаты экспериментальных и клинических исследований в области лучевой терапии и диагностики злокачественных заболеваний, новые достижения молекулярной радиобиологии и радиологии в этой области. Основное внимание было направлено на рассмотрение закономерностей и молекулярно-клеточных механизмов радиочувствительности нормальных и опухолевых клеток/тканей, современных подходов к управлению их радиочувствительностью; применение радиомодификаторов в лучевой терапии опухолей; отдаленные последствия радиотерапии, постлучевые осложнения. Обсуждались возможности прогнозирования эффективности лучевой терапии, выявление новых биомаркеров индивидуальной радиочувствительности злокачественных новообразований, новые подходы к индивидуальному планированию лучевой и комбинированной терапии в рамках развития персонализированной медицины. Рассмотрены клинические эффекты новых методов лучевой терапии; использование радиофармпрепаратов в диагностике и терапии опухолей.

Тезисы докладов представлены в авторской редакции

Содержание

ПРОТОННАЯ КОНФОРМНАЯ ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ ВНУТРИЧЕРЕПНЫХ ОПУХОЛЕЙ: ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ И КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ НА МЕДИЦИНСКОМ ПРОТОННОМ ПУЧКЕ ОИЯИ <i>А.В. Агапов, В.Н. Гаевский В.Н., Е.В. Кижжаев, Е.И. Лучин, Г.В. Мицын, А.Г.Молоканов, М.А. Цейтлина, С.В. Швидкий, К.Н. Шипулин</i>	9
СРАВНЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ФОКУСОВ γ -H2AX ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ И IN VIVO ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЫШАМ NOD SCID <i>Н.И. Атаманюк, Д.И. Осипов, С.С. Андреев, А.Е. Алдибекова, Е.А.Пряхин</i>	12
АНАЛИЗ ПОВЫШЕННОГО РИСКА ОНКОГЕНЕЗА У ЖИТЕЛЕЙ РЕГИОНОВ РАДИОНУКЛИДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОСЛЕ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС <i>Л.С. Балева, А.Е. Сипягина, В.С. Сухоруков, Н.М. Карахан</i>	15
ПРОТОННОЕ ОБЛУЧЕНИЕ ТОНКИМ СКАНИРУЮЩИМ ПУЧКОМ В ВЫСОКОЙ ДОЗЕ СОЛИДНОЙ ФОРМЫ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ <i>Т.А. Белякова, В.Е. Балакин, С.И. Заичкина, О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, Н.С. Стрельникова, А.Е. Шемяков, С.С. Сорокина</i>	18
РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОННЫХ ПУЧКОВ СВЕРХВЫСОКОЙ МОЩНОСТИ ДОЗЫ <i>В.К. Боженко, А.М. Шишкин, А.В. Иванов, В.Н. Васильев, Е.В. Хмелевский, О.А. Безбородова, Р.Н. Плавник, Е.В. Грабовский, Г.М. Олейник, Ю.А. Быков, Е.Г. Крастелев, В.П. Смирнов</i>	21
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ПЛАЦЕНТАРНОЙ ТКАНИ В ЛЕЧЕНИИ МЕСТНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ КОЖИ <i>В.А. Брунчуков, Т.А. Астрелина, В.А. Никитина, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова, Д.Ю. Усупжанова, А.А. Расторгуева, О.А. Максимова, В.Е. Крючихин, С.В. Лищук, Е.А. Дубова, К.А. Павлов, В.А. Брумберг, А.Ю. Бушманов, А.С. Самойлов</i>	23
РАДИОПРОТЕКТОРЫ КАК СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ ЗДОРОВЫХ ТКАНЕЙ ПРИ РАДИОХИМИОТЕРАПИИ <i>М. В. Васин, И. Б. Ушаков</i>	25
РАДИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА ИНОЗИНА С СО (II) НА КЛЕТКИ КРОВИ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL ПРИ ОСТРОМ ОДНОКРАТНОМ ОБЛУЧЕНИИ <i>Н.Н. Веялкина, Е.М. Кадукова, Е.В. Цуканова, К.Н. Шафорост, А.С.Абдуллаев, Э.Н.Шамилов</i>	29
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА Б-190 В КАЧЕСТВЕ РАДИОМОДИФИКАТОРА, ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ <i>Т.Н.Власенко, Н.В.Аксенова</i>	32

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ И ЗАЩИТА НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ МЕЛАТОНИНОМ ПРИ РАДИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ.	35
<i>А.И. Газиев</i>	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕКТРА НЕЙТРОНОВ ПРИ РАБОТЕ МЕДИЦИНСКОГО УСКОРИТЕЛЯ ЭЛЕКТРОНОВ	38
<i>П.П. Ганцовский, М.В. Желтоножская, Ю.А. Комаров, Е.Н. Лыкова, А.Г. Цовьянов, А.П. Черняев</i>	
МОДИФИКАЦИЯ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ИНГИБИТОРОМ ГЛИКОЛИЗА ГЛЮКОЗАМИНОМ D.	40
<i>Н.Я. Гильяно, Ф.М. Ибатуллин, М.М. Дуботолова, Л.А. Носкин, С.И. Степанов.</i>	
ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМОВ ХИМИОЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ С УЧЁТОМ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛАТИНЫ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ	43
<i>Д.А. Гиневский, П.В. Ижевский, И.Н. Шейно</i>	
ОЦЕНКА НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА У БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ПО ЧАСТОТЕ КЛЕТОК С ПОЛИСОМИЕЙ ХРОМОСОМ 7 И 11 ПОСЛЕ ГАММА-ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ	45
<i>Е.В. Голуб, Г.Ф. Михайлова, Т.Г. Шкаврова, В.В.Цепенко, В.В. Польшкин, Ю.А. Панасейкин, П.А. Исаев</i>	
ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ: ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ РАДИОМОДИФИКАТОРОВ И СРЕДСТВ СОПРОВОЖДЕНИЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ	48
<i>А.Н. Гребенюк, В.Д. Гладких</i>	
МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ОБЛУЧЕНИЯ В РАМКАХ РАЗРАБОТКИ МЕТОДИКИ «СПАСИТЕЛЬНОЙ» ВНУТРИПРОСВЕТНОЙ ВЫСОКОМОЩНОСТНОЙ БРАХИТЕРАПИИ РЕЦИДИВА РАКА ПИЩЕВОДА ПОСЛЕ ПРОВЕДЁННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ С ЦЕЛЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОПУСТИМОЙ ГЛУБИНЫ ПРОРАСТАНИЯ	51
<i>А.В. Демьянович, Д.Б. Санин, С.В. Гамаюнов, В.В. Мартынова, Н.Б. Борышева, Л.Н. Титова, И.Н. Иванова, А.Н. Магомедова</i>	
ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОК ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО И НЕОИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЙ	54
<i>Е.С. Евстратова, В.Г. Петин</i>	
НАРУШЕНИЕ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ МЫШЕЙ В ОТДАЛЁННЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ОДНОКРАТНОГО ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА	57
<i>А.С. Журник, О.Д. Смирнова, Е.Ю. Москалева</i>	
ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОТВЕТА ПОПУЛЯЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ОДНОКРАТНОЕ И ФРАКЦИОНИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ РЕДКОИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ	60
<i>И.А. Замулаева, О.Н. Матчук, Е.И. Селиванова</i>	

РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВТОРИЧНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И НАВЕДЕННОЙ РАДИОАКТИВНОСТИ В МЕДИЦИНСКОЙ КАБИНЕ ФАЗОТРОНА ОИЯИ ПРИ ПРОТОННОМ ОБЛУЧЕНИИ	63
<i>А.А. Иванов, Т.М. Блохина, Т.М. Бычкова, Н.Ю. Воробьева, Г.В. Мицын, А.Г. Молоканов, О.В. Никитенко, Я.В. Сидакова, С.В. Швидкий, Е.И. Яшкина, В.А. Шушаков, А.Н. Осипов</i>	
АНАЛИЗ СПОНТАННЫХ И G2 ГАММА-ИНДУЦИРОВАННЫХ АБЕРРАЦИЙ ХРОМОСОМ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ	66
<i>Т.И. Иванова, В.А. Хорохорина, Н.И. Сыченкова, Л.И. Крикунова, И.А. Замулаева</i>	
БАНК БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА СЕВЕРСКОГО БИОФИЗИЧЕСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА	69
<i>Д.С. Исубакова, Е.В. Брониковская, О.С. Цымбал, М.В. Халюзова, Н.В. Литвяков, И.В. Мильто, Л.Р. Тахауов, Р.М. Тахауов</i>	
РАЗРАБОТКА РАДИОЗАЩИТНЫХ И РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ФТОРИДА ЦЕРИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ.	72
<i>К.А. Каменских, А.Л. Попов, А.М. Ермаков, В.К. Иванов</i>	
НАЛИЧИЕ ИНТЕГРАЦИИ ДНК ВПЧ16 И ПРОГНОЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ II СТАДИИ.	75
<i>В.И. Киселева, Л.С. Мкртчян, Л.И. Крикунова, Л.В. Любина, Г.П. Безяева, Л.В. Панарина, Н.М. Липунов, И.А. Замулаева</i>	
ДЕЙСТВИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ И ПРОТОНОВ НА САРКОМУ М-1 КРЫС	78
<i>А.Е. Корецкая, В.В. Южаков, К.С. Корчагина, Н.К. Фомина, С.Н. Корякин, А.Н. Соловьев, М.Г. Цыганова, И.Э. Ингель, Л.Е. Севанькаева, Н.Д. Яковлева, Ю.С. Романко</i>	
ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ В КЛЕТКАХ V-79 ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТОНОВ, ИОНОВ УГЛЕРОДА И ВТОРИЧНЫХ ТЯЖЕЛЫХ ЗАРЯЖЕННЫХ ЧАСТИЦ	81
<i>Е.В. Корякина, М.В. Трошина, В.И. Потетня, Р.М. Байкузина, С.Н. Корякин, А.А. Лычагин</i>	
НОВЫЙ МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА КЛЕТКИ ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ	84
<i>Е.А. Красавин, А.В. Борейко, И.А. Замулаева</i>	
РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ ЭНДОГЕННОГО СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА КАК ВОЗМОЖНОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО МАРКЕРА РАДИОЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ NOS	86
<i>М.Ю. Ксендзук, В.И. Суринова, А.А. Шитова, О.В. Солдатова, Л.И. Шевченко, А.С. Филимонов, М.В. Филимонова, А.С. Сабурова</i>	
ЛУЧЕВЫЕ ПНЕВМОФИБРОЗЫ: КОРРЕЛЯЦИИ СУПРЕССИИ ИММУНИТЕТА С РЕГУЛЯТОРНЫМИ Т-КЛЕТКАМИ	88
<i>Е.Г. Кузьмина, Т.Ю. Мушкарина, Т.В. Константинова</i>	

«IN VIVO» ДОЗИМЕТРИИ ПРИ АДЬЮВАНТНОЙ БРАХИТЕРАПИИ РАКА ЭНДОМЕТРИЯ	91
<i>Г.З. Кулиева, В.Ф. Степаненко, В.В. Богачева, Н.Б. Борышева, В.В. Дон, Л.И. Крикунова</i>	
ПРИМЕНЕНИЕ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ КОНДИЦИОННОЙ СРЕДЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ЗАЖИВЛЕНИЯ ЛУЧЕВЫХ ЯЗВ КОЖИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ	93
<i>В.Г. Лебедев, Ю.Б. Дешевой, А.А. Темнов, Т.А. Насонова, А.В. Лырщикова, О.А. Добрынина, Т.А. Астрелина, Б.Б. Мороз</i>	
ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ ПРОТОНАМИ НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ МЫШЕЙ	96
<i>К.Н. Ляхова, Д.М. Утина, И.А. Колесникова, Ю.С. Северюхин, М. Лалковичова</i>	
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РАДИОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ	99
<i>Е.В. Мурзина, Г.А. Софронов, А.С. Симбирцев, Н.В. Аксенова, О.М. Веселова</i>	
ОЦЕНКА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК (TREG)	102
<i>Т.Ю. Мушкарина, Т.В. Константинова, Е.Г. Кузьмина, Л.Ю. Гривцова</i>	
MFISH: ВОЗМОЖНОСТИ И ПРЕИМУЩЕСТВА МЕТОДА ПРИ АНАЛИЗЕ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗЛУЧЕНИЕМ РАЗНОГО КАЧЕСТВА	105
<i>Е.А. Насонова</i>	
<i>GEUM RIVALE L.</i> КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ СОПРОВОЖДЕНИЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ	108
<i>А.А. Орлова, М.Н. Пovyдыш, А.Н. Гребенюк</i>	
РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ЦИТРАТ-СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГАФНИЯ (HfO ₂)	111
<i>Н.Р. Попова, Г.С. Таран, Д.Д. Колманович, А.Л. Попов, Т.О. Шекунова, В.К. Иванов</i>	
ОЦЕНКА МЕТОДОМ ЭНДОТЕСТА МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ рчАФП И рчГКСФ НА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК	113
<i>Е.А. Пряхин, Г.А. Тряпицына, И.А. Шапошникова, Н.А. Обвинцева, Ю.И. Остроумов, П.С. Шмелин, А.В. Аклеев</i>	
ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОГЛИИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВЫ В РАЗНЫХ ДОЗАХ	116
<i>А.В. Родина, Ю.П. Семочкина, Г.А. Посыпанова, М.Г. Ратушняк, Е.Ю. Москалева</i>	
КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ γ ,n-ИЗЛУЧЕНИЯ	119
<i>А.В. Родина, Ю.П. Семочкина, В.Г. Шуватова, Е.Ю. Москалева</i>	

РАДИОМОДИФИКАТОР БЕТАЛЕЙКИН НЕ ЗАЩИЩАЕТ ПЕРЕВИВНУЮ КАРЦИНОМУ ЛЬЮИСА У МЫШЕЙ ОТ ОБЛУЧЕНИЯ	122
<i>Л.М. Рождественский, А. А. Липенгольц, В.В. Зорин</i>	
ИНФРАКРАСНОЕ ТЕРМОГРАФИЧЕСКОЕ (ИКТ) ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА ГАЛАЗОЛИН ПРИ МЕСТНОМ ЛУЧЕВОМ ПОРАЖЕНИИ ЗДОРОВЫХ ТКАНЕЙ	125
<i>Н.М. Ставракова, В.Н. Мальцев, М.Д. Воронцова, А.В. Даценко, А.А. Иванов</i>	
ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И РАДИОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНИСТЕИНА КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ СОПРОВОЖДЕНИЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ	128
<i>О.Ю. Стрелова, Л.С. Теслов, К.В. Волкова, Р.А. Тарумов, А.Н. Гребенюк</i>	
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ НОВЫХ ОСТЕОТРОПНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ, МЕЧЕННЫХ ГАЛЛИЕМ-68	131
<i>В.К. Тищенко, В.М. Петриев, А.А. Михайловская, К.А. Кузенкова, И.Н. Завестовская</i>	
БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРИСТЫХ КРЕМНИЕВЫХ НАНОЧАСТИЦ, МЕЧЕННЫХ РЕНИЕМ-188, В ОРГАНИЗМЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ	134
<i>В.К. Тищенко, В.М. Петриев, А.А. Михайловская, А.В. Кабашин, Е.Д. Степченкова, И.Н. Завестовская</i>	
ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ СИНЕРГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ФИЗИЧЕСКИХ АГЕНТОВ С ХИМИЧЕСКИМИ ВЕЩЕСТВАМИ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ	136
<i>М.С. Толкаева, Е.С. Евстратова</i>	
ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НИЗКИХ ДОЗ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА	138
<i>Д.Ю. Усупжанова, Т.А. Астрелина, В.А. Никитина, Ю.Б. Сучкова, И.В. Кобзева, В.А. Брунчуков, А.А. Расторгуева, В.А. Брумберг, А.Ю. Бушманов, А.С.Самойлов</i>	
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РЕГЛАМЕНТИРОВАННОЙ ДОЗЫ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ГОЛОВНОЙ МОЗГ	141
<i>И.Б. Ушаков, В.П. Федоров, А.Н. Асташова</i>	
ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ОДНОКРАТНОМ И ФРАКЦИОНИРОВАННОМ РАДИАЦИОННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ	144
<i>В.П. Федоров, О.П. Гундарова, Н.В. Сгибнева</i>	
ОСОБЕННОСТИ РАДИОМОДИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРОВ СИНТАЗ ОКСИДА АЗОТА И ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ЯДЕРНОЙ МЕДИЦИНЕ	147
<i>А.С. Филимонов, М.В. Филимонова, М.В. Макачук, Л.И. Шевченко, А.С. Сабурова, В.И. Суринова, М.Ю. Ксендзук, А.А. Шитова, О.В. Солдатова</i>	

РАЗРАБОТКА НОВЫХ КОМБИНАЦИЙ ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ В ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ <i>А.Н. Филимонова, Е.С. Евстратова, В.Г. Петин</i>	150
ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАДИОНУКЛИДНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ПОМОЩИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ С КОСТНЫМИ МЕТАСТАЗАМИ <i>И.К. Хвостунов, В.В. Крылов, Т.Ю. Кочетова, А.А. Родичев, Н.Н. Шепель, О.Н. Коровчук, В.С. Пятенко, Т.И. Хвостунова</i>	153
ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА <i>А.А. Цицинатти, С.М. Роднева, Н.М. Сметанина, Ю.А. Федотов, Д.В. Гурьев</i>	155
РАЗНЫЕ СПОСОБЫ УЧЕТА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ <i>О.Г. Чередниченко, А.Л. Пилюгина</i>	158
РАЗВИТИЕ ПРОГРАММ ПОДГОТОВКИ И ПЕРЕПОДГОТОВКИ МЕДИЦИНСКИХ ФИЗИКОВ В МОСКОВСКОМ УНИВЕРСИТЕТЕ <i>А.П. Черняев, П.Ю. Борщевская, С.М. Варзарь, М.В. Желтоножская, Лыкова Е.Н, Нусимов С.У., В.В. Розанов</i>	161
МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ РАДИАЦИОННОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК В ПЛАНИРОВАНИИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ <i>И.Н. Шейно, О.А. Угарова, Ю.А. Федотов</i>	164
РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ РАДИООТВЕТА В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА <i>Л.В. Шуленина, В.Ф. Михайлов, Д.В. Салеева, Н.Ф. Раева, А.Ф. Ткачева, Г.Д. Засухина</i>	167
ТЕРМО-РАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, УСТОЙЧИВЫХ К ХИМИОТЕРАПИИ <i>А.О. Якимова, А.В. Хохлова, В.А. Мосина, А.Е. Кабаков</i>	170
PROTON BORON CAPTURE THERAPY: NOVEL APPROACH TO PROTON THERAPY <i>Pavel Bláha, Lorenzo Manti, Chiara Feoli</i>	173
MATHEMATICAL EVALUATION OF ROBUSTNESS OF IMPT PLANS <i>V. Vondracek, J. Kubes, M. Andrlík, M. Navrátil, J. Rosina, A. N. Grebenyuk</i>	176

ПРОТОННАЯ КОНФОРМНАЯ ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ ВНУТРИЧЕРЕПНЫХ ОПУХОЛЕЙ: ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ И КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ НА МЕДИЦИНСКОМ ПРОТОННОМ ПУЧКЕ ОИЯИ

*А.В. Агапов,¹ В.Н. Гаевский В.Н.,¹ Е.В. Кижжаев,² Е.И. Лучин,¹ Г.В. Мицын,¹
А.Г.Молоканов,¹ М.А. Цейтлина,¹ С.В. Швидкий,¹ К.Н. Шипулин¹*

¹Объединенный Институт Ядерных Исследований (ОИЯИ), Международная межправительственная научно-исследовательская организация, г. Дубна, РФ, ул. Жолио-Кюри, д.6. (e-mail: yluchin@mail.ru; +7-903-710-09-40).

²Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования Минздрава РФ, Кафедра радиотерапии и радиологии, г. Москва, РФ.

Резюме. Биомедицинские исследования начались в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ в середине 1960-х годов XX века. В 1967 г. первый пациент получил протонную терапию в ОИЯИ. В 2000 г. впервые в России была разработана 3D-конформная технология протонной терапии. Ее основными особенностями являются использование современных иммобилизирующих голову устройств, топометрия на базе КТ и МРТ, трехмерное компьютерное планирование. За прошедшие 17 лет проведена протонная терапия более 1250 пациентам с положительными клиническими результатами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протонная терапия, трехмерное облучение, внутричерепные новообразования

PROTON CONFORMAL RADIATION THERAPY OF INTRACRANIAL TUMORS: TECHNOLOGY AND CLINICAL EXPERIENCE AT THE JINR

*A.V. Agapov,¹ V.N. Gaevsky,¹ E.V. Kizhaev,² E.I. Luchin,¹ G.V. Mytsin,¹ A.G. Molokanov,¹
M.A.Tseitlina,¹ C.V. Shvidkiy,¹ K.N. Shipulin¹*

¹Joint Institute for Nuclear Research (JINR), Dubna, Russia, yluchin@mail.ru

²Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health, Radiotherapy branch, Moscow, Russia.

Biomedical research started at the Laboratory of Nuclear Problem of JINR in the 1960. First patient received proton irradiation in the 1967 year. In 2000 year, the technology of three-dimensional proton irradiation was developed in JINR. Main features were using modern immobilization devices, topometry with CT and MRI, and three-dimensional computer treatment planning. During 17 years, more than 1250 patients with intracranial tumors have been treated by proton radiation therapy in Dubna. Clinical and imaging results demonstrated high efficacy and low morbidity of proton irradiation.

Key words: proton radiation therapy, three-dimensional treatment planning, intracranial tumors

Физические основы протонной лучевой терапии. Терапевтические протонные пучка обладают очень выгодными физическими свойствами для лучевой терапии. Это конечный легко регулируемый пробег в тканях, зависящий от энергии протонов и плотности тканей по пути пробега, отсутствие облучения позади мишени, резкий градиент дозы латерально и дистально, а также повышение дозы вблизи места остановки пучка в глубине – так называемый пик Брэгга. Вышеуказанные свойства позволяют сконцентрировать дозу в мишени примерно в 2 раза лучше, чем фотонные источники.

Биомедицинские исследования начались в Лаборатории Ядерных Проблем

ОИЯИ в середине шестидесятых годов двадцатого века. Это были пионерские работы в мировом масштабе. В 1967 году первый пациент получил протонную лучевую терапию в ОИЯИ. Это было первое в СССР и 4-е в мире использование протонов в терапевтических целях. До настоящего времени протонная лучевая терапия в Дубне развивается и активно используется для лечения больных. Новый этап развития протонной терапии начался в 2000-2001 годах. В это время было организовано специализированное радиологическое отделение в МСЧ №9 ФМБА. Одновременно с этим впервые в России была разработана новая современная трехмерно-конформная технология протонной лучевой терапии. Основные методические и технологические этапы предлучевой подготовки и проведения облучения изложены ниже. К ним относятся: 1) Изготовление иммобилизирующих устройств для облучаемой области (головы, таза). 2) Топометрическая подготовка – проведение рентгеновского и магнитно-резонансного исследования в фиксирующем устройстве и введение срезов в программу планирования. 3) Трехмерное компьютерное планирование облучения. 4) Изготовление индивидуальных устройств формирования терапевтического протонного пучка – фигурных коллиматоров и компенсирующих болусов. 5) Верификация и реализация плана облучения. Этап подготовки к облучению заканчивается изготовлением рассчитанных по программе планирования индивидуальных болусов-тормозителей и фигурных коллиматоров.

Само протонное облучение проводится, как правило, фракционированно – ежедневно, за исключением выходных дней, в течение нескольких недель.

Некоторые результаты лечения отдельных заболеваний. С 2000 по 2019 гг. проведено протонное облучение более, чем 1250 больных.

АВМ	85 пациентов
Аденомы гипофиза	29
Ангиомы кавернозные	9
Астроцитомы	59
Глиомы\глиобластомы	89
Меланомы	32
Менингиомы	230
Метастазы в мозг	83
Невриномы	27
Рак кожи	83
Рак молочной железы	54
Хордомы и хондросаркомы черепа	52
Опухоли головы и шеи	34
Другие	75
Всего	1250

Ниже приводятся результаты анализа итогов лечения на протонном пучке с двумя из многочисленных нозологий – артериовенозных мальформаций (АВМ) головного мозга, а также хордомами и хондросаркомами основания черепа.

Артериовенозные мальформации (АВМ) головного мозга – это патологические сосудистые образования, возникшие на стадии трансформации первичных эмбриональных анастомозов в капилляры. АВМ обычно проявляются внутричерепными кровоизлияниями в мозг, реже эпилептическими приступами, головными болями, очаговой неврологической симптоматикой. Половина АВМ неоперабельны. Обычно заболевают молодые люди.

С декабря 2001 г. по сентябрь 2009 г. протонная «радиохирургия» была проведена 55 больным в возрасте от 7 до 52 лет (средний возраст 30.4 года). Для

планирования облучения использовался международный протокол. Доза в изоцентре для малых и средних АВМ составляла 25 Гр-экв, для больших – 22.5 Гр-экв. Количество сеансов равнялось двум. Облитерация патологических сосудов АВМ происходит в сроки от 6 до 24 мес. Полная облитерация сосудов АВМ произошла в 42% случаев, частичная облитерация в 56%. Из них у 10 человек частичная облитерация была почти полной и составляла от 80 до 99%. У одного пациента эффект не был получен.

Хордомы и хондросаркомы основания черепа – это довольно редкие злокачественные новообразования, располагающиеся в анатомически сложных локализациях.

Основным методом лечения хордом и хондросарком основания черепа остается хирургический, но инфильтративный характер роста и близкое расположение к критическим структурам головного мозга затрудняют выполнение радикальных операций. Почти у 90% пациентов после хирургии сохраняется остаточный объем опухоли, а у ряда больных хирургическое вмешательство не проводится из-за высоких рисков осложнений. При отсутствии лечения средняя продолжительность жизни составляет от 18 до 28 мес.

С 2002 по 2019 годы протонная трехмерно-конформная лучевая терапия проведена 52 больным с хордомами основания черепа. Средний объем опухоли составил 42 см³ (4-154 см³). Средняя суммарная очаговая доза на изоцентр дозного поля равнялась 73 Гр-экв (63-80 Гр-экв). 1 Гр-экв = 1 Гр физический X 1.1 ОБЭ протонов. Разовые дозы равнялись 1.8-2.25 Гр-экв. Количество сеансов составляло до 35. Дозы на критические структуры (ствол мозга, хиазма зрительных нервов) не превышали толерантных значений. Средняя доза на поверхность ствола головного мозга составляла 62 Гр-экв (от 57 до 64 Гр-экв). Хиазма зрительных нервов в среднем получала 46 Гр-экв (от 9 до 56 Гр-экв).

Период катамнестического наблюдения в среднем составил 60 мес (от 2 до 160 месяцев). Из 40 пациентов у 30 сохраняется контроль опухоли (уменьшение или стабилизация новообразования). Десять больных по различным причинам выпали из наблюдения. У 2 больных развился краевой рецидив.

Острые лучевые реакции и осложнения наблюдались у 7 больных, соответствующие 2 баллам по шкале RTOG, со стороны слизистых оболочек рото- и носоглотки, конъюнктивы глаза и кожных покровов в области полей облучения. Ни со стороны ствола головного мозга, ни со стороны зрительного аппарата признаков лучевой токсичности и поздних лучевых осложнений не отмечено.

Выводы. Протонная лучевая терапия на пучках фазотрона ОИЯИ является эффективной и безопасной методикой лечения хордом и хондросарком основания черепа и других внутричерепных новообразований.

**СРАВНЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ФОКУСОВ γ -H2AX ПРИ ОБЛУЧЕНИИ
ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ И IN VIVO ПОСЛЕ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЫШАМ NOD SCID**

Н.И. Атаманюк, Д.И. Осипов, С.С. Андреев, А.Е. Алдибекова, Е.А.Пряхин
ФГБУН Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА
России, г. Челябинск, Россия; e-mail: vita_pulhra@mail.ru

Резюме: Измерена интенсивность флуоресценции фокусов γ -H2AX (маркер двунитевых разрывов ДНК) в лимфоцитах человека после их гамма-облучения в модели *in vivo* (ксенотрансплантация мышам линии NOD SCID) и двух моделях *in vitro*. Обнаружено, что фоновое количество фокусов γ -H2AX в модели *in vivo* соответствует таковому в суспензии лимфоцитов сразу после выделения из периферической крови, однако после облучения в дозе 10 Гр количество фокусов γ -H2AX в модели *in vitro* возрастает сильнее, чем *in vivo*. При облучении культуры бласттрансформированных лимфоцитов этот показатель оказался повышенным исходно и не изменялся после облучения. Только для лимфоцитов без бласттрансформации *in vitro* было отмечен эффект снижения радиационно-индуцированного выхода фокусов γ -H2AX при применении радиопротектора меркамина.

Ключевые слова: фокусы γ -H2AX, радиопротектор, иммунодефицитные мыши, ксенотрансплантация, NOD SCID

**γ -H2AX FOCI ASSAY OF IRRADIATED HUMAN LYMPHOCYTES IN CULTURE
AND IN VIVO AFTER TRANSPLANTATION TO NOD SCID MICE**

N.I. Atamanyuk, D.I. Osipov, S.S. Andreev, A.E. Aldibekova, E.A. Pryakhin
Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia, e-mail:
vita_pulhra@mail.ru

Summary: The number of γ -H2AX foci, a molecular marker of double-stranded DNA breaks, has been estimated in human lymphocytes after their gamma-irradiation *in vivo* after xenotransplantation to NOD SCID mice and in cell culture models *in vitro*. It was found that the background number of γ -H2AX foci in the *in vivo* model corresponds to that in a suspension of intact lymphocytes isolated from peripheral blood. However, after irradiation at a dose of 10 Gy, the number of γ -H2AX foci in this cell culture increases more than *in vivo*. In the culture of blast-transformed lymphocytes, this indicator was increased initially and did not change after irradiation. Only in the culture of non-blast-transformed lymphocytes *in vitro* a decrease of the radiation-induced yield of γ -H2AX foci when using the radioprotector cysteamine hydrochloride was discovered.

Key words: γ -H2AX assay, radioprotector, immunodeficient mouse, xenotransplantation, NOD SCID

Одной из важных задач при планировании лучевой терапии является оценка индивидуальной радиочувствительности пациента и чувствительности опухолевых клеток. Исследования радиочувствительности *in vitro* не в полной мере отражают реакцию организма и опухоли на радиационное воздействие. Это делает актуальной разработку экспериментальных технологий оценки радиочувствительности клеток человека *in vivo*.

При ксенотрансплантации опухолевых и иммунных клеток человека иммунодефицитным мышам возможно оценить эффективность и механизм действия разных тактик лечения, чувствительность клеток к лучевой или комбинированной терапии, провести доклинические испытания лекарственных средств [1]. Есть

исследования, показывающие различия в действии противоопухолевых агентов при сравнении результатов, полученных на культурах клеток *in vitro* и на ксенотрансплантатах *in vivo* [2].

Цель данной работы: сравнить образование фокусов γ -H2AX при облучении лимфоцитов человека в культуре и *in vivo* после трансплантации мышам NOD SCID, а также влияние на их образование вещества с известным радиопротекторным действием меркамина.

Гистон H2AX является одним из факторов репарации ДНК, при появлении двунитевых разрывов ДНК образуется его фосфорилированная форма γ -H2AX. Фокусы γ -H2AX считаются маркерами двунитевых разрывов, используются для оценки цитотоксических воздействий разного рода на клетки [3]. Меркамин (меркаптоэтиламина гидрохлорид) оказывает радиопротекторное действие на клетки при облучении за счет снижения количества радикалов и ионизированных молекул [4].

Материалы и методы. Лимфоциты выделяли на градиенте плотности из периферической крови человека (3 донора). Часть клеток вносили в питательную среду 199 и использовали в тот же день (культура нетрансформированных лимфоцитов).

Поскольку при пересадке мышам NOD SCID лейкоциты человека через 2-3 недели заселяют лимфоидные органы мыши, где происходит реакция бласттрансформации человеческих лимфоцитов, была использована также модель бласттрансформированных лимфоцитов *in vitro*. Для этого часть клеток инкубировали на среде RPMI с добавлением фитогемагглютинина в течение 72 ч. Основную часть клеток сразу после выделения вводили внутривентриально мышам NOD SCID, по 2 животных для каждого донора.

Животных и культуры клеток облучали в дозе 10 Гр на исследовательской гамма-установке ИГУР-1М (^{137}Cs -источники, мощность дозы 0,91 Гр/мин). Нетрансформированные лимфоциты облучали через 1 час после выделения, бласттрансформированные лимфоциты облучали после 72 ч инкубации; к половине каждой суспензии клеток за 15 мин до облучения добавляли меркамин в концентрации 0,21 мг/мл. Животных облучали через 21 день после трансплантации клеток, за 15 мин до облучения одному из двух животных, получивших клетки от одного донора, внутривентриально вводили меркамин 205 мг/кг веса мыши.

Измеряли интенсивность флуоресценции γ -H2AX в культурах лимфоцитов и в крови животных через 30 и 120 мин после облучения. В крови мышей подсчитывали человеческие CD45⁺ клетки и определяли γ -H2AX в них. Через 2 часа после облучения животных забивали и измеряли человеческие CD45⁺ клетки и фокусы γ -H2AX в суспензии клеток, полученных из селезенки.

Фиксацию и пермеабиллизацию клеток проводили с использованием набора BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences). В фиксированных клетках окрашивали γ -H2AX с помощью антител Alexa Fluor 488 Mouse anti-H2AX. Мерой количества фокусов γ -H2AX служило медианное значение флуоресценции антител. Затем добавляли антитела для человеческого CD45 антигена (мышинные моноклональные антитела anti-human CD45-APC, Stem Cell Technologies) и мышинового CD45 антигена (крысиные моноклональные антитела anti-mouse CD45-PE). Для исключения ложноположительного окрашивания клеток добавляли блокаторы Fc рецепторов человека и мыши (BD Biosciences). Измерения проводили на проточном цитометре AccuriC6. Для анализируемых показателей рассчитывали среднее арифметическое и ошибку среднего. Достоверность отличий определяли с помощью критерия Манна-Уитни. Достоверными считали отличия при $p \leq 0,05$.

Отмечено, что в этих двух моделях отличался как исходный уровень флуоресценции γ -H2AX, так и его изменение после облучения. В

нетрансформированных лимфоцитах через 30 мин после облучения количество фокусов γ -H2AX возросло в 16 раз по сравнению с исходным уровнем ($U = 0$; $Z = -1,96$; $p = 0,05$). Бласттрансформированные лимфоциты показали фоновое значение фокусов γ -H2AX в 5,5 раз больше, чем в лимфоцитах без бласттрансформации ($U = 0$; $Z = -1,96$; $p = 0,05$), причем этот показатель после облучения изменялся незначительно. Предположительно, повышенное количество фокусов γ -H2AX в культуре бласттрансформированных лимфоцитов связано с активным делением клеток.

Оценивали влияние классического радиопротектора меркамина на количество радиационно-опосредованных повреждений ДНК при его применении *in vitro* и *in vivo*. Для нетрансформированных лимфоцитов добавление меркамина в культуральную среду за 15 мин до облучения не влияло на фоновый уровень фокусов γ -H2AX, но снижало выход радиационно-индуцированных фокусов γ -H2AX в 2,6 раз через 30 и 120 мин после облучения ($U = 0$; $Z = -1,96$; $p = 0,05$). Однако, в культуре лимфоцитов после бласттрансформации радиозащитное действие меркамина выявлено не было.

Фоновое количество фокусов γ -H2AX в человеческих CD45⁺ клетках, циркулирующих в крови мышей на 21 сутки после трансплантации, соответствовало фоновому значению этого показателя для культуры лимфоцитов без бласттрансформации, но через 30 мин после облучения животных количество фокусов γ -H2AX выросло только в 2 раза ($U = 0$; $Z = -1,96$; $p = 0,05$) против 16-тикратного увеличения в культуре, не меняясь через 120 мин. Но в отличие от модели *in vitro*, не отмечено защитного действия меркамина при его предварительном введении животным.

В CD45⁺ клетках человека, выделенных через 120 мин после облучения из селезёнок животных, уровень фокусов γ -H2AX оказался в 4 раза больше, чем в человеческих клетках, циркулирующих в периферической крови ($U = 0$; $Z = -1,96$; $p = 0,05$), и был сопоставим с количеством γ -H2AX, зарегистрированным в культуре бласттрансформированных лимфоцитов *in vitro*, что должно объясняться, по-видимому, активной пролиферацией этих клеток.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют отличия как фонового количества фокусов γ -H2AX, так и степень увеличения их числа после облучения при использовании разных моделей *in vitro* и *in vivo*. Также отличным оказался и эффект снижения радиационной индукции двунитевых разрывов ДНК, регистрируемый по числу фокусов γ -H2AX, при добавлении радиопротектора меркамина в культуральную среду или введении в организм животных. Предполагается, что использование модели *in vivo* позволит точнее оценить чувствительность клеток к облучению и модифицирующее влияние на чувствительность клеток разных веществ, чем модель *in vitro*.

Список литературы:

1. Ito R., Takahashi T., Ito M. Humanized mouse models: application to human diseases // *J. Cell. Physiol.* 2018. Vol. 233. P. 3723–3728.
2. Klovov D., MacPhail S., Banáth J. et al. Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays // *Radiotherapy and Oncology.* 2006. Vol. 80. P. 223–229.
3. Kuo L.J. and Yang L.X. γ -H2AX – a novel biomarker for DNA double-strand breaks // *In Vivo.* 2008. Vol. 22. P. 305-310.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. М.: Новая волна, 2012. 1216 с.

АНАЛИЗ ПОВЫШЕННОГО РИСКА ОНКОГЕНЕЗА У ЖИТЕЛЕЙ РЕГИОНОВ РАДИОНУКЛИДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОСЛЕ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС

Л.С. Балева, А.Е. Сипягина, В.С. Сухоруков, Н.М. Карахан

Обособленное структурное подразделение «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. акад. Ю.Е. Вельтищева» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский Национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, asipyagina@pedklin.ru

Резюме

Оценена экспрессия генов генной сети белка p53 по технологии Nanostring (США); показана возможность прогнозирования риска опухолеобразования у жителей регионов радионуклидного загрязнения. Установлены наиболее значимые различия с группой сравнения для 5 генов: *ST13*, *IER3*, *BRCA1*, *LRDD*, *MRAS*. Используемая технология высокочувствительна. Однонаправленность изменений экспрессии одинаковых генов у матерей с онкопатологией и их детей позволяет предполагать трансгенерационную передачу специфических последствий радиационного воздействия.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, дети, I-II поколения облученных лиц, технология Nanostring, генная сеть белка p53, онкогенез.

ANALYSIS OF INCREASED ONCOGENESIS RISK IN RADIONUCLIDE CONTAMINATED REGIONS RESIDENTS AFTER THE CHERNOBYL ACCIDENT

L. S. Baleva, A. E. Sipyagina, V. S. Sukhorukov, N. M. Karakhan

Separate Structural Unit " Acad. Veltishev's Research Clinical Institute of Pediatrics" Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education " Pirogov's Russian National Research Medical University" Ministry of Health Russian Federation, Moscow, asipyagina@pedklin.ru

Summary

Gene expression of p53 protein's gene network was evaluated at Nanostring technologies (USA); the possibility of predicting the risk of tumors growth in inhabitants of the radionuclide contaminated regions was shown. The most significant differences were shown in group of comparison for 5 genes: *ST13*, *IER3*, *BRCA1*, *LRDD*, *MRAS*. The using technology is highly sensitive. Unidirectional changes in the expression of the same genes at mothers with cancer and their children suggest transgenerational specific effect's transmission of radiation exposure.

Key words: ionizing radiation, children, I-II generations of irradiated persons, Nanostring technology, gene network protein p53, oncogenesis.

Роль белка p53, как координатора развития опухолей, проявляется в эволюции как адаптация долгоживущих организмов, накапливающих большое количество соматических мутаций [1]. Важность p53 в поддержании стабильности генома наглядно демонстрируется данными о наличии мутантного p53 в примерно половине человеческих опухолей. Белок p53 выполняет множество функций, направленных на регуляцию клеточной миграции, аутофагии, анаэробного и аэробного гликолизом и других аспектов метаболизма клетки. Белок является модулятором клеточной дифференцировки [2, 3]. Ген *TP53* является центральным в процессе канцерогенеза, вовлечен во взаимодействие с большим количеством других генов и их белковых продуктов, образуя отрицательные и положительные связи, формируя компенсаторные

механизмы, координирующие работу всей геномной сети *TP53*. Т.о., имеет смысл изучение всей геномной сети *TP53*.

Для исследования использован метод Nanostring (США), преимущество которого заключается в измерении количества иРНК без ферментативных реакций и разведений, благодаря чему повышается чувствительность и скорость метода [4], отмечается высокая воспроизводимость результатов в двух повторных исследованиях с коэффициентом корреляции 0,999. Сравнительные исследования показали, что технология Nanostring более чувствительна, чем технология Аггау; проще в выполнении и производительнее, чем ПЦР в реальном времени по технологии Taqman.

Поэтому технология Nanostring высокоэффективна в исследовании больших геномных сетей. Исследование может быть актуально при различных полигенных нарушениях, вызванных внешними мутагенными воздействиями. Важную роль такие исследования могут играть при оценке генетических дефектов и онкогенных рисков у лиц, подвергшихся длительному радиационному облучению. Исследования геномной сети белка p53, связанной с онкогенезом, особенно актуальны.

Цель исследования: с помощью анализа экспрессии генов геномной сети белка p53 по технологии Nanostring (США) показать возможность оценки риска опухолеобразования у различных поколений жителей территорий радиоактивного загрязнения.

Материалы и методы. Обследовали 36 постоянных жителей регионов радионуклидного загрязнения вследствие аварии на ЧАЭС (группа наблюдения): из них 13 матерей, родившихся в 1969-1987 г.г.- I поколение жителей с онкопатологией. II-е поколение - дети, рожденные этими матерями (23 ребенка в возрасте до 18 лет) без признаков радиационно-индуцированных заболеваний, в том числе онкопатологии.

В группу сравнения вошло 12 человек: из них 6 – I-е поколение, 6 – II-е поколение (сопоставимых по годам рождения), проживающих в регионах, не подвергшихся радиационному воздействию.

Для анализа экспрессии генов геномной сети белка p53 использовались образцы РНК, выделенные из лимфоцитов периферической крови обследуемых зондами с 50 нуклеотидной комплементарностью к последовательности РНК исследуемого гена. Результаты были нормированы и статистически обработаны.

Геномная сеть белка p53 состоит из огромного количества генов. При создании панели для этой сети мы отобрали 102 гена, наиболее тесно связанных на молекулярном и на функциональном уровне с геном *TP53*. 6 генов домашнего хозяйства были выбраны в качестве контрольных. Экспрессия генов геномной сети p53 анализировалась на цифровом анализаторе нуклеиновых кислот nCounter (Nanostring technologies). Обработка данных осуществлялась с помощью статистического пакета NCSS 11. Полученные в группах данные сравнивались между собой по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

Результаты. При оценке уровня экспрессии всех изученных генов было обнаружено 24 гена со статистически значимыми различиями между основной группой и группой сравнения. Из них наиболее значимыми оказались различия для 5 генов: *ST13*, *IER3*, *BRCA1*, *LRDD*, *MRAS*.

Данные для I и II поколений статистически достоверно для всех 5 генов отличались от таковых группы сравнения. При сравнении данных для I и II поколения статистически значимых различий обнаружено не было [5].

Обсуждение и выводы. В ходе анализа результатов, полученных с помощью технологии Nanostring, было выявлено 24 статистически достоверно изменяющих свою экспрессию генов геномной сети белка p53, из них было выбрано 5 генов, подвергшихся значительно более сильным изменениям экспрессии.

Повышение уровня экспрессии генов: *IER3* - высоко экспрессируется во многих опухолевых тканях; дискутируется роль экспрессии гена в регуляции апоптоза; имеется тесная связь между экспрессией *IER3* и мутантным *TP53*, выражающаяся большими размерами и более продвинутой стадией опухоли; *ST13* - понижение экспрессии *ST13* может приводить к риску развития карциномы желудка и колоректальной карциномы [6]; экспрессия этого гена в группе наблюдения повышена относительно группы сравнения, что может являться результатом ответа организма на длительно существующий высокий риск возникновения опухоли или радиационно-индуцированную активацию процессов канцерогенеза. Достоверное снижение уровня экспрессии генов: *BRCA1*, *LRDD*, *MRAS* приводит к увеличению риска рака молочной железы и яичников [7]; уменьшению апоптотической активности в ответ на генотоксические стимулы; изменения кодируемых белков ассоциированы со множеством типов других злокачественных опухолей.

Проведенное нами пилотное исследование с помощью метода Nanostring technology с наличием однонаправленных изменений экспрессии одних и тех же генов у матерей (I поколение) и их детей (II поколение) позволяет предполагать наличие трансгенеративной передачи специфических последствий облучения и, соответственно, риска онкогенеза, что, однако, требует своего дальнейшего исследования и подтверждения.

Изменения экспрессии в четырех из пяти исследуемых генов относительно значений в группе сравнения свидетельствуют о повышенном риске развития злокачественных новообразований у жителей радиационно-загрязненных территорий.

Список литературы

1. Amaral J. D. et al. The role of p53 in apoptosis //Discovery medicine. 2010; 9 (45): 145-152.
2. Olovnikov I. A., Kravchenko J. E., Chumakov P. M. Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense //Seminars in cancer biology. Academic Press, 2009; 19 (1): 32-41.
3. Molchadsky A. et al. P53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention //Carcinogenesis. 2010; 31 (9): 1501-1508.
4. Geiss G. K. et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs //Nature biotechnology. 2008; 26 (3): 317-325.
5. LS Baleva, VS Sukhorukov, T Marshall, AE Sipyagina, H Abe, AS Voronkova, NM Karakhan, P Barach, AR Sadykov, NI Egorova and SV Suchkov. Higher risk for carcinogenesis for residents populating the isotope-contaminated territories as assessed by NanoString Gene Expression Profiling. //J. Translational Science. 2017; 3(3): 1-6.
6. Wang L. B. et al. Expression of ST13 in colorectal cancer and adjacent normal tissues //World journal of gastroenterology. 2005; 11 (3): 336-339.
7. Hedau S. et al. Expression of BRCA1 and BRCA2 proteins and their correlation with clinical staging in breast cancer //Journal of cancer research and therapeutics. 2015; 11 (1): 158-160.

ПРОТОННОЕ ОБЛУЧЕНИЕ ТОНКИМ СКАНИРУЮЩИМ ПУЧКОМ В ВЫСОКОЙ ДОЗЕ СОЛИДНОЙ ФОРМЫ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ

*Т.А. Белякова¹, В.Е. Балакин¹, С.И. Заичкина², О.М. Розанова², Е.Н. Смирнова²,
Н.С. Стрельникова¹, А.Е. Шемяков^{1,2}, С.С. Сорокина²*

¹Физико-технический центр ФГБУН Физического института им. П.Н.Лебедева РАН, Протвино, Россия, ²ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия, e-mail: belyakovatanya@mail.ru

Резюме. В экспериментах на мышах было исследовано действие двукратного облучения тонким сканирующим пучком протонов в суммарной дозе 60 и 80 Гр на рост солидной формы асцитной карциномы Эрлиха. В результате показано, что облучение в дозе 80 Гр приводило к полной регрессии первичных опухолей, в два раза снижало частоту рецидивов, не влияя на среднюю продолжительность жизни мышей с рецидивами и без них, но увеличивало медиану продолжительности жизни на 35 %, по сравнению с облучением в дозе 60 Гр.

Ключевые слова: протоны, гипофракционирование, тонкий сканирующий пучок, мыши, асцитная карцинома Эрлиха

HIGH-DOSE IRRADIATION OF THE SOLID FORM OF EHRLICH ASCITES CARCINOMA IN MICE WITH A PENCIL SCANNING BEAM OF PROTONS

*T.A. Belyakova¹, V. E. Balakin¹, S. I. Zaichkina², O. M. Rozanova², E. N. Smirnova²,
N. S. Strelnikova¹, A. E. Shemyakov¹, S. S. Sorokina²*

¹ Physical Technical Center, P.N. Lebedev Physical Institute of RAS, Protvino, Russia, ² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, Russia, e-mail: belyakovatanya@mail.ru

Summary. The effect of double irradiation with a pencil scanning beam of protons at the total doses of 60 and 80 Gy on the growth of solid Ehrlich ascites carcinoma has been studied. The results of experiments show that the irradiation at a dose of 80 Gy led to the complete regression of tumor nodes, a twofold decrease in the frequency of recurrences without affecting the mean life span of mice with and without relapses but increased the median of life span by 35 % compared with a group of 60 Gy.

Key words: proton therapy, hypofractionation, pencil scanning beam, mice, Ehrlich ascites carcinoma

Большая часть пациентов, которые на сегодняшний день получили протонную терапию (ПТ), облучалась по технологии пассивного рассеяния пучка, пучками с неоптимальным энергетическим спектром, и другими менее совершенными методами, которые доступны и могут быть реализованы в настоящее время. Предпринимаются шаги по разработке для протонов многолепестковых коллиматоров, однако они пока менее эффективны, чем подобные устройства для фотонной терапии [1]. В последнее время используется наиболее перспективный вид ПТ – тонкий («карандашный») сканирующий пучок протонов (ТСПП), который обеспечивает однородность дозы в мишени, снижает вклад в дозу вторичных частиц и лучевую нагрузку на кожу. Преимущества ТСПП открывают новые возможности дальнейшего совершенствования ПТ при исследовании различных режимов гипофракционированного облучения, которые за счет уменьшения количества фракций и увеличения разовой дозы позволяют сократить время лечения и повысить его результативность. В современной онкологической практике, помимо подавления роста опухолей, к наиболее важным

показателям эффективности лучевой терапии также относят продолжительность безрецидивного периода, частоту рецидивов и продолжительность жизни пациентов. В связи с ограниченностью числа установок для протонной терапии в настоящее время нет систематических исследований отдаленных последствий ПТ на животных. На базе ФТЦ ФИАН (г. Протвино) Комплекс протонной терапии «Прометеус» разрабатывается и эксплуатируется в рамках научно-исследовательского предприятия, что предоставляет возможность проведения физических и биологических экспериментов.

Цель исследования: изучение действия двукратного облучения ТСПП в суммарных дозах 60 и 80 Гр на рост солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и его отдаленных последствий (продолжительность ремиссии, частота рецидивов, лучевые реакции кожи, средняя продолжительность жизни (СПЖ) у мышей-опухоленосителей.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на самцах мышей колонии SHK с массой тела 24–28 г, которых содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН. В каждой группе было по 30 животных. В качестве модели опухолевого роста была использована солидная форма АКЭ, которая представляет собой быстрорастущую, агрессивную, радиорезистентную, неместазирующую опухоль при 100% гибели животных в течение месяца после инокуляции 1–2 млн клеток. Для индукции АКЭ мышам вводили суспензию в концентрации 2 млн клеток внутримышечно в бедро левой задней лапы. Перед облучением животных наркотизировали смесью ксилазин+золетил и фиксировали на специальной платформе. Для определения объема облучаемой мишени получали томограмму мышцы в водном фантоме и с помощью планирующей системы задавали определяемый объем опухоли (GTV), равный среднему размеру 0,47 см³. GTV-объем облучали двумя фракциями по 30 Гр и 40 Гр за фракцию с интервалом 24 ч. Локальное облучение конечности проводили в водном фантоме на 5-й день после инокуляции, когда опухолевый узел сформировался у всех мышей, на отечественном терапевтическом комплексе протонной терапии «Прометеус» (ФТЦ ФИАН, Протвино) ТСПП с двух встречных направлений сканированием по заданному объему ткани в пике Брэгга. Энергия протонов на выходе ускорителя с направления 0° составляла 85–96 МэВ, а со 180° – 92–100 МэВ, расхождение пучка в этом диапазоне было 2,8–3,6 мм. Контроль дозы осуществляли дозиметром на основе алмазного детектора (ИФТП, Россия) и радиохромной пленкой ЕВТ2.

После облучения регистрировали показатели противоопухолевой эффективности, характеризующие ранние и отдаленные лучевые последствия: динамику роста АКЭ путем определения объема опухолевого узла еженедельно в течение месяца, ранние лучевые реакции кожи согласно рекомендациям RTOG/EORTC-95, длительность ремиссии, частоту рецидивов и СПЖ мышей.

Результаты и обсуждение. При сравнении облучения опухоли в суммарных дозах 60 и 80 Гр на скорость роста АКЭ в течение месяца различий выявлено не было. В группе 60 Гр наблюдали регресс опухолевого узла у 77% мышей, а в группе 80 Гр – у 100%. В обеих группах облученных мышей значимых различий в динамике гибели не наблюдалось, но максимальная продолжительность жизни для группы 80 Гр составила 21 мес по сравнению с 15 мес в группе 60 Гр. Медиана продолжительности жизни (время, в течение которого погибает 50% мышей) для группы 80 Гр составила 154 сут, а для 60 Гр – 114 сут. Облучение по схеме 40+40 Гр оказалось намного эффективнее в отношении рецидивов: 60% мышей с 8 до 21 мес были без опухолей по сравнению с 30% в группе облученной по схеме 30+30 Гр. Первые случаи рецидивов наблюдались на 35 сут, а самые поздние регистрировались через 150 сут после облучения, срок появления и скорость роста рецидивных опухолей была одинакова в обеих группах. Такое экстремальное рецидивирование свидетельствует о том, что за счет сохранения

наиболее радиоустойчивых опухолевых или опухолевых стволовых клеток происходит повторный рост карциномы Эрлиха. В то время как облучение стволовых клеток опухоли высокими дозами протонов в условиях *in vitro* приводит к 100% гибели [2,3], в нашей работе в условиях облучения *in vivo* у мышей с инокулированной ранее опухолью и ослабленным иммунитетом, по-видимому, даже единичные выжившие стволовые клетки могут приводить к индукции вторичной опухоли. Это демонстрирует не только ключевую роль иммунитета в онкогенезе вторичных опухолей, но и актуальность изучения эффективности противоопухолевого лечения с использованием моделей на животных. Средняя продолжительность безрецидивного периода в группах 60 Гр и 80 Гр составляла 62 и 85 сут соответственно. Поскольку СПЖ в обеих группах была примерно одинаковой, мы получили средний суммарный показатель СПЖ для мышей с рецидивами – 108 сут, а без рецидивов – 270 сут. Так как пальпируемый объем опухоли был соизмерим с размером лапы животного, и опухолевый узел примыкал к кожным покровам, то при облучении кожа получала значительную дозу. Лучевые реакции кожи у мышей получивших 80 Гр начали проявляться на 12 сут после облучения, при этом у 67% мышей они были 1-й степени (умеренная эритема, эпителизация, сухой эпидермит); у 4,2% – 2-й степени лучевых поражений (яркая эритема, островковый влажный эпидермит, умеренный отек). Далее тяжесть лучевых поражений нарастала: к 16 сут у 83% мышей наблюдалась 3-я степень лучевых реакций (сливной влажный эпидермит, отек с вдавливанием), а к 19 сут у 46% наблюдалась 4-я степень поражений, характеризующаяся появлением язв и некрозов. Острые лучевые реакции быстро регрессировали и шерстяной покров восстанавливался к 37 сут у 45% мышей, а к 3 мес после облучения полностью отсутствовали какие-либо изменения кожи. По сравнению группой 60 Гр, эти реакции были выражены значительно сильнее как по частоте встречаемости, так и по тяжести протекания.

Выводы. В результате проведенных экспериментов показано, что модель солидной карциномы Эрлиха на мышах может быть использована не только для исследования контроля роста опухоли при различных режимах гиподифракционированного облучения протонами, но и для наблюдения за рецидивами опухоли и другими отдаленными последствиями радиотерапии. Получены характеристики противоопухолевой эффективности режима двукратного облучения ТСПП суммарно в дозе 80 Гр для модели солидной формы АКЭ: возможность полной регрессии первичных опухолей, в два раза снижение частоты рецидивов, увеличение медианы продолжительности жизни на 35%, отсутствие влияния на СПЖ мышей с рецидивами и без рецидивов по сравнению с группой 60 Гр. Выявленные закономерности действия высоких доз ТСПП на опухоли у животных имеют важное значение для понимания перспектив развития протонной терапии.

Список литературы

1. Климанов В.А., Галютдинова Ж.Ж., Забелин М.В. Протонная лучевая терапия: современное состояние и перспективы // "Медицинская физика" 2017. № 2(74). С. 89-121.
2. Narang H., Kumar A., Bhat N. et al. Effect of proton and gamma irradiation on human lung carcinoma cells: Gene expression, cell cycle, cell death, epithelial-mesenchymal transition and cancer-stem cell trait as biological end points // *Mutat. Res.* 2015. Vol. 780. P. 35-46.
3. Zhang X., Lin S.H., Fang B. et al. Therapy-resistant cancer stem cells have differing sensitivity to photon versus proton beam radiation // *J. Thorac. Oncol.* 2013. Vol. 8, № 12. P. 1484-1491

РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОННЫХ ПУЧКОВ СВЕРХВЫСОКОЙ МОЩНОСТИ ДОЗЫ

*Боженко В.К.**, *Шишкин А.М.**, *Иванов А.В.**, *Васильев В.Н.*, *Хмелевский Е.В.[#]*,
Безбородова О.А.[#], *Плавник Р.Н.[#]*, *Грабовский Е.В.[§]*, *Олейник Г.М.[§]*, *Быков Ю.А.[&]*,
Крастелев Е.Г.[&] *Смирнов В.П.[&]*

*РНЦПР Минздрава РФ (Москва), [#]МНИОИ им. П.А. Герцена Минздрава РФ (Москва),
[§]ТРИНИТИ Росатома (Троицк, Москва), [&]ОИВТ РАН (Москва), Россия, e-mail
khmee53@mail.ru

Резюме. Представлены результаты изучения радиобиологических особенностей пучков фотонов сверхвысокой мощности дозы порядка $1,2 \times 10^{10}$ Гр/мин. Данные цитогенетических культуральных исследований, оценка величины ЛД50/30 у мышей DBF1, а также сравнительные результаты противоопухолевого действия фракционированного облучения перевивных карциномы Льюис, саркомы Sa-37 и карциномы толстой кишки C26 не позволяют сделать вывод о заметных отличиях ОБЭ пучков фотонов со сверхвысокой и стандартной терапевтической мощностью дозы. Для более полной оценки необходимы дополнительные исследования, касающиеся влияния дозы, кислородного режима, метаболических особенностей, исходной радиочувствительности объекта и, собственно, величины мощности дозы.

Ключевые слова: фотоны сверхвысокой мощности дозы, ОБЭ, противоопухолевый эффект

RADIOBIOLOGICAL DISTINCTIVE FEATURES AND ANTITUMOR EFFICIENCY OF ULTRA-HIGH DOSE RATE PHOTON BEAMS

Bozhenko V. K.¹, *Shishkin M. A.¹*, *Ivanov A.V.¹*, *Vasiliev V.N.¹* -
Khmelevsky E. V.², *Bezborodova O. A.²*, *Plavnik R.N.²*, *Grabovsky E. V.³*, *Oleinik G. M.³*,
Bykov Yu. A.⁴, *Krastelev E. G.⁴*, *Smirnov V. P.⁴*

¹RSCRR of the Ministry of health of the Russian Federation (Moscow), ²MNIOI P. A. Gertsen Ministry of health of the Russian Federation (Moscow), ³Rosatom TRINITY (Troitsk, Moscow), ⁴OIVT RAS (Moscow)

Summary. A comparative study of radiobiological features of ultra-high dose rate (U-hDR) photons about $1,2 \times 10^{10}$ Gy/min was started on a collimated photon beam of the experimental Angara facility (TRINITY) and was continued on a specialized high-current nanosecond electron accelerator Mir-M (OIVT). Cytogenetic studies performed on different cell cultures, results of LD50/30 value in DBF1 mice and antitumor efficiency of fractionated irradiation (on Lewis carcinoma, Sarcoma -37 and colon carcinoma C26) do not allow us to speak clearly in favor of the noticeable differences between the RBE photon beams with ultra-high and standard therapeutic dose rate. For a more complete assessment of RBE U-hDR photon beams and the possibility of increasing the therapeutic interval, additional studies are needed.

Key words: photon beams of ultra-high dose rate, RBE, antitumor efficiency

Изучение пучков сверхвысокой мощности дозы различных ионизирующих излучений (Ultra-high DR – U-hDR), начинавшееся более 50 лет назад, активизировалось в последнее 10-тилетие в связи с развитием радиационной техники и

созданием новых технологий лучевой терапии. Наибольший интерес вызывают появившиеся данные о «щадящем» действии т. наз. U-hDR – FLASH- радиотерапии.

Собственные исследования радиобиологических особенностей и противоопухолевой эффективности фотонных пучков сверхвысокой мощности дозы было начато нами на коллимированном пучке фотонов экспериментальной установки «Ангара» (ТРИНИТИ) с граничной энергией фотонов - 0,7 Мэв, при мощности дозы в импульсе до 36Гр/мин. Предварительные цитогенетические исследования продемонстрировали повышенную частоту хромосомных aberrаций после использования экспериментального импульсного фотонного излучения в диапазоне доз 1-2Гр, но при облучении в дозах 14-16Гр отличия от стандартного терапевтического гамма-излучения Co-60 исчезали. Величина ЛД50/30 у мышей DBF1 после U-hDR-облучения составила 7,82Гр, что соответствует верхней границе диапазона при стандартной терапевтической мощности дозы 0,5-1,5Гр/мин. Предварительное сравнительное исследование противоопухолевой эффективности экспериментального излучения на перевивной карциноме Льюис (LLC) и Sa -37 (РОД-2,6-13Гр и СОД-18-29,7Гр за 2-4 фракции через день в условиях 15%-ной негетерогенности дозы в облучаемом объеме) продемонстрировало недостоверное преимущество U-hDR-фотонов. Для более детальной оценки противоопухолевого эффекта на базе сильноточного наносекундного ускорителя электронов Мир-М создан специализированный стенд для облучения экспериментальных животных узкими пучками U-hDR-фотонов с мощностью дозы 600 МГр/мин, разовыми дозами 0,5-20Гр, подводимыми в импульсном режиме с длительностью импульса 50-60 нс. Дозиметрия осуществлялась с помощью пленок GafChromic EBТ3, ТЛД- и алмазных детекторов. Достигнутая однородность дозы в поле диаметром 10мм - не хуже 20%. В качестве объектов исследования выбраны перевивные LLC и карцинома толстой кишки С26. Дозу 22,5 Гр подводили за 3 фракции с использованием круглого коллиматора D-20мм. Подавление роста LLC в течение 20-40 дней после воздействия вновь оказалось более глубоким для U-hDR-облучения, в сравнении с контролем (гамма-излучение установки Teratron с мощностью дозы 0,8Гр/мин). Отличий же при более резистентной С26 не зафиксировано, хотя средняя продолжительность жизни после экспериментального воздействия оказалась недостоверно выше, чем после стандартной гамма-терапии.

Полученные нами данные не свидетельствуют в пользу заметных отличий ОБЭ между пучками фотонов со сверхвысокой и стандартной терапевтической мощностью дозы. Для более полной оценки необходимы дополнительные исследования, касающиеся влияния дозы, кислородного режима, метаболических особенностей, исходной радиочувствительности объекта и, собственно, величины мощности дозы.

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ПЛАЦЕНТАРНОЙ ТКАНИ В ЛЕЧЕНИИ МЕСТНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ КОЖИ

*В.А. Брунчуков, Т.А. Астрелина, В.А. Никитина, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова,
Д.Ю. Усупжанова, А.А. Расторгуева, О.А. Максимова, В.Е. Крючихин, С.В. Лищук, Е.А.
Дубова, К.А. Павлов, В.А. Брумберг, А.Ю. Бушманов, А.С. Самойлов*
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия, e-mail:
brunya2008@yandex.ru

Резюме: Источники ионизирующего излучения активно применяют в различных отраслях деятельности человека, сфера их применения постоянно расширяется, что увеличивает риск возникновения радиационных поражений. Известно, что при радиационном поражении кожи происходит повреждение стволовых и пролиферирующих клеток эпидермиса, а так же деструктивные изменения сосудов микроциркуляторного русла [1, 2, 3]. Конечный эффект воздействия ионизирующего излучения определяется балансом между повреждениями в клетках и восстановительными процессами в зоне поражения и прилежащих тканях [2, 4]. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) плацентарной ткани человека, и продуцируемые ими паракринные факторы могут быть использованы для получения препаратов, предназначенных для лечения местных лучевых поражений (МЛП), что заслуживает дальнейшего изучения.

Ключевые слова: МЛП, МСК, клеточная терапия, радиация.

MESENCHYMAL STEM CELLS OF THE PLACENTA IN THE TREATMENT OF LOCAL RADIATION INJURIES OF THE SKIN

*VA Brunchukov, TA Astrelina, VA Nikitina, IV Kobzeva, YuB Suchkova, DYU
Usupzhanova, AA Rastorgueva, OA Maxsimova, VE Kryuchikhin, SV Lischuk, EA Dubova, KA
Pavlov, VA Brumberg, AYU Bushmanov, AS Samoilov*
State Research Center Federal Burnasyan Frderal Medical Biophysical Center of
Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia, e-mail: brunya2008@yandex.ru

Summary: Sources of ionizing radiation are actively used in various fields of human activity, their scope is constantly expanding, which increases the risk of radiation damage. It is known that radiation damage to the skin causes damage to the stem and proliferating cells of the epidermis, as well as destructive changes in the vessels of the microvasculature [1, 2, 3]. The final effect of exposure to ionizing radiation is determined by the balance between damage in cells and repair processes in the affected area and adjacent tissues [2, 4]. Mesenchymal stem cells (MSCs) of human placental tissue and the paracrine factors produced by them can be used to produce drugs intended for the treatment of local radiation injuries LRI, which deserve further study.

Key words: LRI, MSC, cell therapy, radiation.

Цель: Изучение влияния МСК плацентарной ткани человека и их концентрата кондиционированной среды (ПКС) на регенеративные процессы кожи у лабораторных животных с МЛП.

Материалы и методы: В исследовании использовали 80 лабораторных животных (самцы Wistar в возрасте 8-12 недель и массой $210,0 \pm 30,0$ грамм), рандомизированных случайным образом на 4 группы (по 20 животных в каждой): контроль (К), животные не получали терапию; контроль с введением концентрата культуральной среды (КС) трехкратно на 1, 14 и 21 сутки; введение МСК в дозе 2 млн на 1 кг трехкратно на 1, 14 и 21 сутки; введение ПКС в расчетной дозе 2 млн клеток на 1 кг трехкратно на 1, 14 и 21

сутки. Моделировали МЛП проводили на рентгеновской установке ЛНК-268 в дозе 110 Гр. Каждое лабораторное животное наблюдали 17 раз: на 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105, 112 дни после моделирования ожога. Проводили гистологическое (окраска гематоксилином и эозином) и иммуногистохимическое (CD31, CD68, VEGF) исследования.

Результаты: С 14 суток эксперимента регистрировалась открытая раневая поверхность кожи во всех группах животных. Динамика уменьшения площади открытой раневой поверхности была одинакова для всех групп до 42 суток исследования. После наблюдали волновую динамику увеличения и уменьшения открытой раневой поверхности кожи во всех группах, кроме КС. На 112 день площадь открытой раневой поверхности в группе ПКС была в 6,7 раз меньше по сравнению с контрольной группой. Полное заживление открытой раневой поверхности кожи в группах КС отмечалось у 40% и ПКС - у 60%, в группе Пл у 20%, а в группе К не было ни одного животного с затянувшимся раневым дефектом. По данным гистологического исследования отмечали уменьшение воспалительных процессов, наличие зачатков волосяных фолликулов и пролиферации сосудов микроциркуляторного русла в группе ПКС в отличие от других групп, в которых эти изменения были не столь заметны.

Заключение: Таким образом, применение концентрата кондиционированной среды МСК плаценты (группа ПКС) при тяжелых МЛП у лабораторных животных способствует ускорению перехода раневого процесса в стадию регенерации и эпителизации. Интересно, что в одной из контрольной групп при применении концентрата культуральной среды (группа КС) наблюдали значимое уменьшение площади раневой поверхности по сравнению с другими группами на протяжении всего периода наблюдения. Однако, анализ гистологического и иммуногистохимического исследований не позволяет однозначно утверждать об эффективности применения данного типа терапии.

1. Howpel J.W., Coggle J.E., Wells J. et al. The acute effects of different energy beta-emitters on pig and mouse skin // *Drit. J. Radiobiology*. 1968. Suppl. 19. P. 47-51.
2. Осанов Д.П. дозиметрия и радиационная биофизика кожи. М.: Энергоатомиздат, 1983. 152с.,
3. Zheng K., Wu W., Jang S., et al. Bone marrow mesenchymal stem cell implantation for the treatment of radioactivity-induced acute skin damage in rats // *Molecular medicine reports*. 2015. 12: 7065-7071.
4. Аклеев А.В. Хронический лучевой синдром у жителей прибрежных сел реки Теча // Челябинск. - 2012.

РАДИОПРОТЕКТОРЫ КАК СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ ЗДОРОВЫХ ТКАНЕЙ ПРИ РАДИОХИМИОТЕРАПИИ

М. В. Васин¹, И. Б. Ушаков^{2,3}

¹Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава России, ²ФГБУ ГНЦ – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА, Москва, ³Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия, mikhail-v-vasin@yandex.ru

Резюме. Противолучевые лекарственные средства радиопротекторы способны снижать лучевое поражение здоровых тканей при радиохимиотерапии онкологических больных при отсутствии их влияния на радиочувствительность опухолей. Отсутствие эффективности амифостина в ряде исследований возможно связана с кумуляцией его токсических свойств при его повторном применении, которая может снижена с помощью приема аскорбиновой кислоты или мелатонина. Отечественный радиопротектор препарат Б-190 (индралин) обладает выраженными противолучевыми свойствами при ранних и поздних местных лучевых поражениях, в том числе в условиях местного применения на кожу и слизистые ткани с величиной ФУД, равной 1,3-1,5. Гипертензивную реакцию на индралин можно понизить с помощью нитратов при сохранении его противолучевых свойств.

Ключевые слова: радиопротектор, амифостин, мелатонин, препарат Б-190 (индралин), ранние и поздние местные лучевые поражения, радиохимиотерапия

RADIOPROTECTORS AS MEANS OF PROTECTION OF HEALTHY TISSUES AT RADIOCHEMOTHERAPY

M. V. Vasin¹, I. B. Ushakov^{2,3}

¹Russian Medical Academy of continuous professional education of Ministry of Health Care of Russia, Moscow, ² Burnazyan Federal medical biophysical center of FBMA, Moscow, ³Nikiforov All-Russian center of the emergency and radiation medicine of Ministry of Emergency Situation, St. Petersburg, Russia, mikhail-v-vasin@yandex.ru

Summary. Radioprotective medicines radioprotectors are capable to reduce radiation injury of healthy tissues at radiochemotherapy of oncological patients in the absence of their influence on radiosensitivity of tumors. Lack of amifostine efficiency in a number of researches is perhaps connected with cumulation of its toxic effects at its repeated application which can be reduced by means of ascorbic acid or melatonin administration. The domestic radioprotector B-190 (indralin) has expressed radioprotective properties at early and late local radiation injuries, including in the conditions of topical application to skin and mucous with DRF equal 1.3-1.5. Hypertensive reaction induced by indralin can be lowered by means of nitrates administration when maintaining its radioprotective properties.

Keywords: radioprotector, amifostine, melatonin, B-190 (indralin), early and late local radiation injuries, radiochemotherapy

Применение противолучевых средств при радиотерапии онкологических больных предназначено для снижения лучевого поражения здоровых тканей, попадающих под облучение при локальном облучении опухолей. При радиотерапии возможны лучевые поражения кожи, слизистой, сосудов и более глубоко расположенных тканей. В практике радиохимиотерапии онкологических больных в условиях местного фракционированного облучения амифостин при профилактическом внутривенном введении по ряду исследований оказывает противолучевой эффект на

коже и слизистой, регистрируемый по снижению тяжести проявления пострадиационного мукозита ($\text{ФУД} = 1,37$) [1], ранней и поздней ксеростомии и дисфагии [2](Gu et al., 2014), изофагита и легочной радиотоксичности [3], а также кожной эритемы [4] при отсутствии клинических данных по защите ткани опухоли. Негативные результаты по оценке эффективности амифостина в ряде клинических испытаний при радиохимиотерапии отдельных локализаций опухолей [3] может быть отчасти связана с кумуляцией его токсического эффекта при повторном его применении, нивелирующих его противолучевые свойства [5, 6]. Кумулятивный токсический эффект амифостина при его ежедневном применении можно снизить с помощью аскорбиновой кислоты и мелатонина [5]. Кроме того, мелатонин при накожном применении способен снижать поздние местные лучевые поражения (МЛП) [7]. Мелатонин обладает противовоспалительными свойствами и подавляет развитие пострадиационного фиброза облученных тканей, находит применение в клинической практике при радиохимиотерапии онкологических больных [8].

Радиопротектор препарат Б-190 (индралин) предназначен для медицинской защиты персонала при авариях на АЭС [9] и представляет также определенный интерес в плане возможного его применения в практике радиохимиотерапии онкологических больных при наличии у него высоких противолучевых свойств при ранних и поздних МЛП и его способностью снижать гемотоксичность химиотерапевтических средств (препаратов группы платины) [10-12]. Индралин, прямой α_1 -адреномиметик, обладает выраженными противолучевыми свойствами при МЛП, сопоставимых по проявлению своей эффективности при лучевых поражениях кроветворной системы. При парентеральном применении в опытах на мышах индралин обладает защитным эффектом по снижению ранних и поздних МЛП, равным в единицах фактора уменьшения дозы (ФУД) 1,4-1,5. При повторном применении через одни сутки при суммарной дозе 56,7 Гр гамма-облучения радиопротектор полностью сохранял свою противолучевую эффективность, равную по ФУД 1,5-1,7. При парентеральном применении в месте локального облучения защитное действие индралина повышалось. При местном накожном применении индралина в составе мази, а также в спиртовом растворе или в растворе диметилсульфоксида оказывал противолучевой эффект, равный по ФУД 1,3-1,5. Индралин также обладал выраженными противолучевыми свойствами при местном облучении области головы крыс по снижению лучевого поражения слюнных желез с ФУДом, равным 1,5 [7, 12-15].

Одним из препятствий для клинического применения индралина при радиохимиотерапии онкологических больных является способность препарата как α_1 -адреномиметика вызывать гипертензивную реакцию. Установлена возможность с помощью нитратов (монизола) существенно ее снижать при сохранении противолучевых свойств радиопротектора при МЛП [12, 16].

Способность α_1 -адреномиметиков снижать тяжесть МЛП без влияния на радиочувствительность опухоли была подтверждена в экспериментальных исследованиях W.E. Fahl [17] в случае накожного применения норадrenalина или фенилэфрина. В клинических условиях противолучевой эффект норадrenalина при его накожном применении в месте локального облучения по снижению тяжести острых МЛП при радиотерапии онкологических больных с раком молочной железы составил по ФУДу величину, равную 1,4 [18].

Препарат Б-190 при приеме внутрь 3-х таблеток по 0,15 предварительно разжевывается во рту, что позволяет оказывать его защитный эффект на слизистую рта с максимальным его проявлением через несколько мин. Данный алгоритм его применения удобен для локальной защиты слизистых при радиотерапии опухолей головы и шеи. Противолучевые свойства индралина на слюнных железах достигают

максимума через 30-60 мин после его приема. Индралин как α_1 -адреномиметик способен снижать гемотоксичность карбоплатины после ее введения. Данный эффект усиливается при сочетанном применении радиопротектора с флавонолом кверцетином [11].

Заключение Противолучевые лекарственные средства радиопротекторы способны снижать лучевое поражение здоровых тканей при радиохимиотерапии онкологических больных при отсутствии их влияния на радиочувствительность опухолей. Отечественный радиопротектор препарат Б-190 (индралин) обладает выраженными противолучевыми свойствами при острых и поздних МЛП, в том числе в условиях местного применения на кожу и слизистые ткани с величиной ФУД, равной 1,3-1,5. Гипертензивную реакцию на индралин можно снижать при применении нитратов без влияния на его противолучевую активность.

Список литературы

1. Trog D., Bank P., Wendt T.G. et al. Daily amifostine given concomitantly to chemoradiation in head and neck cancer. A pilot study // *Strahlenther. Onkol.* 1999. V. 175. № 9. P. 444-449.
2. Gu J., Zhu S., Li X. Effect of amifostine in head and neck cancer patients treated with radiotherapy: a systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials // *Plos One.* 2014. V. 9. № 5:e95968. doi: 10.1371/journal.pone.0095968. eCollection 2014.
3. Devine A., Marignol L. Potential of amifostine for chemoradiotherapy and radiotherapy-associated toxicity reduction in advanced NSCLC: a meta-analysis // *Anticancer Res.* 2016. V. 36. № 1. P. 5-12.
4. Dunst J., Semlin S., Pigorsch S. et al. Intermittent use of amifostine during postoperative radiochemotherapy and acute toxicity in rectal cancer patients // *Strahlenther. Onkol.* 2000. V. 176. № 9. P. 416-421.
5. Васин М.В., Ушаков И.Б., Ковтун В.Ю. и др. Влияние мелатонина, аскорбиновой и янтарной кислот на кумуляцию токсического эффекта гаммафоса (амифостина) при его повторном применении // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2004. Т. 137. № 5. С. 515-518.
6. Rades D., Fehlauer F., Bajrovic A. et al. Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients // *Radiother. Oncol.* 2004. V. 70. № 3. P. 261-264.
7. Васин М.В., Ушаков И.Б., Ковтун В.Ю. и др. Сравнительная эффективность антиоксиданта мелатонина и радиопротекторов индралина и мезатона при местных лучевых поражениях // *Радиац. биол. Радиоэкол.* 2004. Т. 44. № 1. С. 68-71.
8. Najafi M, Shirazi A, Motevaseli E. et al. The melatonin immunomodulatory actions in radiotherapy // *Biophys. Rev.* 2017. V. 9. № 2. P. 139–148. doi: 10.1007/s12551-017-0256-8
9. Ильин Л.А., Ушаков И.Б., Васин М.В. Противолучевые средства в системе радиационной защиты персонала и населения при радиационных авариях // *Медюрадиол. Радиац. безопасность.* 2012. Т. 57. № 3. С. 26–31.
10. Васин М.В., Ушаков И.Б., Ковтун В.Ю. и др. Влияние радиопротектора индралина на гемотоксичность карбоплатины // *Бюлл. экспер. биол. мед.* 2006. Т.141. № 4. С. 422–425.
11. Васин М. В., Ковтун В. Ю., Комарова С. и др. Эффективность кверцетина и радиопротектора Б-190 при сочетанном применении: снижение гемотоксичности карбоплатины // *Вопр. онкол.* 2012. Т. 58. № 1. С. 77-80.

12. Васин М.В., Ушаков И.Б., Ковтун В.Ю. Радиопротектор индралин при ранних и поздних проявлениях местных лучевых поражений // Вопр. лнкол. 2016. Т. 62. № 3. С. 406-412.
13. Васин М.В., Суворов Н.Н., Ушаков И.Б. Противолучевая эффективность индралина при локальном гамма-облучении кожи // Радиационная биология. Радиоэкология. 1998. Т. 38. № 1. С. 42-54.
14. Васин М.В., Ушаков И.Б., Семенова Л.А. и др. Противолучевая эффективность альфа-адреномиметиков при локальном гамма-облучении кожи // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39. № 2-3. С. 249-253.
15. Васин М.В., Ушаков И.Б., Коровкина Э.П., Ковтун В.Ю. Противолучевые свойства индралина по снижению тяжести лучевого поражения слюнных желез // Радиационная биология. Радиоэкология. 2004. Т. 44. № 3. С. 333–335.
16. Васин М.В., Ганьшина Т.С., Мирзоян М.С. и др. Митигирующий эффект нитратов (монизола) на фармакодинамические сдвиги в сердечно-сосудистой системе под действием радиопротектора индралина // Бюлл. экспер. биол. мед. 2018. Т. 165. № 3. С. 240-343.
17. Fahl W.E. Complete prevention of radiation-induced dermatitis using topical adrenergic vasoconstrictors. Arch. Dermatol. Res. 2016. V. 308. № 10. P. 751-757.
18. Cleary J.F., Anderson B.M., Eickhoff J.C. et al. Significant suppression of radiation dermatitis in breast cancer patients using a topically applied adrenergic vasoconstrictor. Radiat. Oncol. 2017. V. 12. № 1. P. 201. doi: 10.1186/s13014-017-0940-7.

РАДИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА ИНОЗИНА С СО (II) НА КЛЕТКИ КРОВИ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL ПРИ ОСТРОМ ОДНОКРАТНОМ ОБЛУЧЕНИИ

*Н.Н. Веялкина¹, Е.М. Кадукова¹, Е.В. Цуканова¹, К.Н. Шафорост¹, А.С.Абдуллаев²,
Э.Н.Шамилов²*

¹ Государственное научное учреждение «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Гомель, Беларусь, ² Национальная Академия Наук Азербайджана, Институт радиационных проблем, г.Баку, Азербайджан, e-mail: expmodels@irb.basnet.by

Резюме. Оценено влияние внутрибрюшинного введения комплексного соединения кобальт (II) инозинат на клетки крови мышей линии C57Bl при однократном облучении. Не выявлено значимого влияния на восстановление клеточного состава лейкоцитов периферической крови животных через месяц после облучения в дозе 5 Гр. Отмечено снижение уровня апоптоза лимфоцитов периферической крови и полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге животных, получавших кобальт (II) инозинат после облучения в дозе 1,5 Гр.

Ключевые слова: инозин, кобальт (II) инозинат, облучения, мыши линии C57Bl

RADIOPROTECTIVE EFFECT OF CO(II) INOSINATE ON THE BLOOD CELLS OF C57BL/6 MICE AFTER ACUTE SINGLE EXPOSURE γ -RADIATION

*Veyalkina N.N.¹, Kadukova A.M.¹, Tsukanova E.V.¹, Shafarost K.N.¹, Abdullayev A.S.²,
Shamilov E.N.²*

¹Institute of radiobiology of National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus,

²National Academy of Sciences of Azerbaijan, Institute of Radiation Problems, Baku, Azerbaijan, e-mail: expmodels@irb.basnet.by

Summary. The effect of intraperitoneal administration of cobalt (II) inosinate complex and inosine on the blood cells of C57Bl mice under the action of ionizing radiation was evaluated. No significant effect was found on the restoration of the cellular composition of peripheral blood leukocytes in animals one month after irradiation at dose of 5 Gy. A decrease in the level of apoptosis of peripheral blood lymphocytes and polychromatophilic erythrocytes with micronuclei in the bone marrow in groups of animals treated with inosine and cobalt (II) inosinate after irradiation at a dose of 1.5Gy was observed.

Key words: inosine, cobalt (II) inosinate irradiation, C57Bl mice

Для снижения отрицательных последствий сверхнормативного облучения проводятся широкомасштабные работы по поиску, созданию и испытанию новых высокоэффективных препаратов, способных модифицировать повреждающие эффекты ионизирующего излучения. Перспективным направлением в последние годы является синтез комплексов металлов с хелатирующими лигандами [1]. Инозин, как нуклеозид пурина, является предшественником аденозинтрифосфата, с ионами металлов образует малотоксичные и мембранопроницаемые комплексы. Ранее было показано, что из основных природных рибонуклеозидов, входящих в состав РНК, инозин и гуанозин обладают ярко выраженными антиоксидантными и радиозащитными свойствами [2].

В связи с этим актуальным является изучение радиозащитных свойств комплексов инозина с биогенными металлами, которые будут обладать минимальной токсичностью, способностью устранять негативное действие ионизирующего излучения и широким спектром физиологического действия.

Цель работы – сравнительное изучение противолучевых свойств инозина и комплексной соли инозината кобальт (II) при однократном остром облучении.

Материалы и методы. Эксперименты были проведены на лабораторных мышах линии C57Bl обоого пола в возрасте 2-2,5 месяцев. Общее однократное равномерное облучение животных проводили с помощью закрытого источника γ -излучения – радионуклид ^{137}Cs , мощность дозы 0,62 Гр/мин. Для оценки влияния исследуемого соединения на восстановление показателей периферической крови животные были облучены в дозе 5 Гр, наблюдение проводилось в течение 30 суток. Для оценки влияния исследуемого соединения на уровень микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга и уровень клеточной гибели лимфоцитов периферической крови животные были облучены в дозе 1,5 Гр, они были выведены из эксперимента на 2-е сутки после облучения.

Комплексная соль инозина – кобальт (II) инозинат был предоставлен организацией-соисполнителем по проекту – Институтом Радиационных Проблем НАН Азербайджана.

Растворы инозина и кобальт(II) инозинат вводили животным опытных групп внутривенно в дозе 45 мг/кг через 15 мин после облучения.

Периферическую кровь получали при декапитации под наркозом на 30-е сутки после облучения. Лейкоциты и эритроциты подсчитывали в камере Горяева. Относительное содержание лейкоцитов определяли путем цитологического исследования мазков крови.

Приготовление цитологических препаратов для микроядерного анализа проводили по стандартной методике.

Лимфоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови на градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, США). Проводили анализ количества апоптотических лимфоцитов на проточном цитофлюориметре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США) с использованием набора Annexin V – FITC Apoptosis Kit (Invitrogen, США).

Полученные результаты были проанализированы с помощью методов вариационной статистики. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты. У мышей, которым после облучения в дозе 5 Гр вводили кобальт(II) инозинат, на 30 сутки после облучения количество лейкоцитов было снижено по отношению к уровню контроля на 64,5% ($p < 0,05$), что свидетельствует об отсутствии влияния исследуемого соединения на лейкоцитарный росток гемопоэза облученных животных.

Количество эритроцитов у мышей, которым после облучения в дозе 5 Гр вводили инозин, на 30-е сутки было снижено по отношению к значению в контроле на 16,3% ($p < 0,05$). В то же время у мышей, которым после облучения вводили кобальт(II) инозинат, количество эритроцитов соответствовало уровню контроля. Таким образом, при дозе облучения 5 Гр эти комплексы обладают некоторой эритропоэтической активностью.

При введении раствора инозина облученным животным наблюдалось снижение количества полихроматофильных эритроцитов с микроядрами. Данный показатель значимо отличался от такового в группе облученных животных и составил $1,04 \pm 0,25\%$, при $1,8 \pm 0,45\%$ в группе облученного контроля. Снижение количества клеток с микроядрами отмечено и в группах животных, которым вводили кобальт(II) инозинат до $0,90 \pm 0,32\%$ ($p < 0,05$). Однако, по сравнению с необлученными животными количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в данных группах оставалось повышенным.

У животных, облученных в дозе 1,5 Гр, на 2 сутки после облучения отмечено снижение количества жизнеспособных лимфоцитов и повышение лимфоцитов на стадии раннего апоптоза до $13,14 \pm 2,26\%$ и позднего апоптоза до $5,26 \pm 1,09\%$, а также на стадии некроза до $1,7 \pm 0,71\%$.

В группе, животные которой после облучения получали инъекцию инозина, отмечено повышенное количество жизнеспособных лимфоцитов – $83,64 \pm 3,13\%$, и сниженное количество лимфоцитов на стадии раннего и позднего апоптоза $10,78 \pm 3,90\%$ и $4,58 \pm 1,22\%$ по сравнению с группой облученных животных. По сравнению с группой животных без облучения содержание клеток на стадии апоптоза и некроза оставалось повышенным. В группах животных, которым вводили кобальт (II) инозинат, также отмечено снижение количества лимфоцитов на стадии раннего и позднего апоптоза до $8,94 \pm 2,74\%$ и $4,46 \pm 1,79\%$ соответственно.

Заключение. Оценено влияние внутрибрюшинного введения комплексного соединения кобальт (II) инозинат и инозина на клетки системы крови мышей линии C57Bl при действии ионизирующего излучения. Отмечено, что исследуемое соединение обладает эритропоэтической активностью, но не было выявлено значимого влияния на восстановление клеточного состава лейкоцитов периферической крови животных через месяц после облучения в дозах 5 Гр. Отмечено снижение уровня апоптоза лимфоцитов периферической крови и полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге в группах животных, получавших инозин и кобальт (II) инозинат через 48 часов после облучения в дозе 1,5 Гр.

Список литературы

1. Gasimova G.E., Aghayeva A.S., Abdullayev A.S., Shamilov E.N., Qahramanova Sh.I., Jalaladdinov F.F. "Synthesis and study of the radioprotective properties of a Co(II) complex of zinc with tryptophan" // Journal of Radiation Researches. Baku, 2018. Vol.5, №2. P. 241-246.
2. Гудков С.В., Штаркман И.Н., Смирнова В.С. и др. Гуанозин и инозин как природные антиоксиданты и радиопротекторы для мышей при действии летальных доз γ -облучения // Докл. РАН. 2006. Т. 407, № 1. С. 115-118.

Работа выполнена при поддержке совместного проекта ГКНТ Беларусь и НАН Азербайджана (№ Б18АЗГ-002).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА Б-190 В КАЧЕСТВЕ РАДИОМОДИФИКАТОРА, ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

Т.Н.Власенко, Н.В.Аксенова

ФГБВОУ ВО «Филиал (г.Москва) Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова»,
Москва, Россия, e-mail: vlasenko_t_n@mail.ru

Резюме. В экспериментах на мышах установлено, что при применении препарата Б-190 до радиационного воздействия выживаемость облученных в дозах СД_{50-90/30} мышей растет, а глубина постлучевых нарушений гемопоэза снижается. Учитывая данные об эффективности этого препарата для защиты нормальных тканей от лучевых ожогов, представляется целесообразным применение Б-190 при лучевой терапии.

Ключевые слова: препарат Б-190, облучение, лучевая терапия.

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF THE B-190 APPLICATION AS A RADIOMODIFIER PROSPECTIVE FOR RADIATION THERAPY OF TUMORS

T.N.Vlasenko, N.V.Aksenova

Branch of the S.M. Kirov Military Medical Academy, Moscow, Russia,
e-mail: vlasenko_t_n@mail.ru

Summary. In experiments on mice, it was found that with the use of the B-190 preparation before radiation exposure, the survival rate of mice irradiated in doses of LD_{50-90/30} increases, and the depth of postradiation hematopoiesis disorders decreases. Given the data on the effectiveness of this drug to protect normal tissues from radiation burns, it seems appropriate to use B-190 in radiation therapy.

Key words: B-190 preparation, irradiation, radiation therapy.

Для повышения эффективности и снижения побочных эффектов лучевой терапии могут использоваться различные группы лекарственных средств, в том числе радиопротекторы [1, 2]. Применение радиопротекторов в этих случаях направлено на защиту здоровых тканей, попадающих под облучение при лучевой терапии [2]. На территории Российской Федерации из большого числа изученных радиопротекторов разрешен к клиническому применению только препарат Б-190 (индралин) [3].

Цель исследования: экспериментальное обоснование возможности использования препарата Б-190 в качестве радиомодификатора при лучевой терапии опухолей.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования выполнены на 250 мышах-самцах белых беспородных и гибридах. Общее относительно равномерное рентгеновское облучение осуществляли на установке РУМ-17 при напряжении 180 кВ, силе тока 15 мА, фильтре 0,5 мм Cu + 1,0 мм Al, мощности дозы 52,2 Р/мин, кожно-фокусном расстоянии 50 см; общее четырехстороннее воздействие γ -излучением ¹³⁷Cs на животных осуществляли на установке ИГУР-1 с мощностью дозы 130 Р/мин, кожно-фокусном расстоянии 1 м. Препарат Б-190 вводили внутривенно в дозе 200 мг/кг, разведенным в 0,5 мл 0,5 % раствора крахмала за 15 мин до радиационного воздействия.

Оценку радиозащитной эффективности препарата Б-190 проводили путем изучения 30-суточной выживаемости, средней продолжительности жизни погибших животных и динамики их гибели; количества сохранивших жизнеспособность гемопоэтических клеток костного мозга; абсолютного числа лейкоцитов, содержания нейтрофилов и лимфоцитов в циркулирующем пуле крови; постлучевых изменений

функционально-метаболического статуса нейтрофилов периферической крови.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что при применении препарата Б-190 до радиационного воздействия выживаемость облученных в дозах $CD_{50-90/30}$ мышей растет, а глубина постлучевых нарушений гемопоэза снижается.

Показано, что профилактическое применение препарата Б-190 позволяло защитить часть мышей от лучевой гибели. Так, при воздействии γ -излучением дозе 6,3 Гр выживаемость мышей, которым за 15 мин до облучения вводили препарат Б-190, увеличилась на 10%, при облучении в дозе 6,8 Гр – на 15%, при радиационном воздействии в дозе 7,3 Гр – на 30%. Подвергнутых рентгеновскому облучению в дозе 8,0 Гр мышей использование Б-190 позволяло спасти от лучевой гибели более чем на 26,7% от количества животных, в то время как в контрольной группе погибали все мыши.

Кроме того, профилактическое применение Б-190 позволяло эффективно предотвратить постлучевое уменьшение количества 9-ти суточных колониобразующих единиц на селезенках облученных мышей, оцененных в методике эндогенного колониобразования, что свидетельствует о сохранении жизнеспособности стволовых кроветворных клеток и повышении под влиянием препарата активности гемопоэза.

Применение препарата Б-190 также оказывало стимулирующее влияние на нейтрофилы периферической крови облученных животных, что проявлялось в достоверном увеличении содержания гликогена, повышении активности миелопероксидазы и щелочной фосфатазы в этих клетках по сравнению с аналогичными показателями контрольных групп. Также применение препарата Б-190 способствовало снижению глубины раннего постлучевого ингибирования миелопероксидазы и более быстрой нормализации активности данного фермента.

Противолучевые свойства Б-190 связаны с прямым действием этого препарата на α_1 -адренорецепторы, развитием вазоконстрикторного эффекта, снижением напряжения кислорода в подкожной клетчатке и костном мозге [1, 2]. Возможным механизмом является также усиление потребления кислорода, что при наличии фармакологической циркуляторной гипоксии может существенно усилить гипоксию в клетках и тем самым резко повысить радиорезистентность здоровых тканей при лучевой терапии [2]. Подтверждением этого является тот факт, что применение Б-190 позволяет снизить глубину постлучевых нарушений гемопоэза, уменьшить выраженность лейкопении, ускорить восстановление основных субпопуляций лейкоцитов, нормализовать функционально-метаболический статус нейтрофилов, что, в конечном счете, приводит к увеличению выживаемости облученных в дозах $CD_{50-100/30}$ мышей.

Выводы. Полученные нами результаты свидетельствуют о возможности применения препарата Б-190 в качестве перспективного радиомодификатора при лучевой терапии опухолей. Учитывая данные об эффективности этого препарата для защиты нормальных тканей от лучевых ожогов [4] и возможность его применения у человека [3], представляется целесообразным применение Б-190 при лучевой терапии.

Список литературы

1. Гребенюк А.Н., Легеза В.И., Назаров В.Б., Тимошевский А.А. Медицинские средства профилактики и терапии радиационных поражений. СПб: Фолиант, 2011. 92 с.
2. Васин М.В. Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии // Радиационная биология. Радиозэкология. 2013. Т. 53. № 5. С. 459-467.
3. Гребенюк А.Н., Гладких В.Д. Современное состояние и перспективы

разработки лекарственных средств для профилактики и ранней терапии радиационных поражений // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 2. С. 132-149.

4. Васин М.В., Ушаков И.Б., Ковтун В.Ю. и др. Радиопротектор индралин при ранних и поздних проявлениях местных лучевых поражений // Вопросы онкологии. 2016. Т. 62. № 3. С. 406–412.

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ И ЗАЩИТА НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ МЕЛАТОНИНОМ ПРИ РАДИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ.

А.И. Газиев

ФГБУ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
г. Пущино, e-mail: gaziev.iteb@gmail.com

За последнее 25 лет произошел серьезный сдвиг в радиобиологической парадигме. Возникновение двунитевых разрывов (ДР) ядерной ДНК (яДНК) и митохондриальной дисфункции, с повышением окислительного стресса, сегодня рассматривается как два критических события, приводящих к гибели клеток или к развитию отдаленных последствий в виде онкогенеза, нейродегенеративных заболеваний и других патологий человека. Если в процессе радиотерапии для подавления опухолевого роста требуется ингибирование репарации ДР яДНК, то для снижения лучевых нагрузок на нормальные ткани необходимо обеспечить защиту и подавление митохондриальных дисфункций.

Исследования, начатые 25 лет назад, показали, что при облучении клеток микропучками ионизирующих излучений (ИИ) наблюдалась индукция сестринских хроматидных обменов (СХО) не только в клетках-мишенях, но и в клетках, находящихся вблизи и не подвергавшихся воздействию радиации. В прилежащих клетках также были установлены генные мутации, появление микроядер, ДР яДНК, активация экспрессии генов, нестабильность генома в нескольких поколениях клеток и их дальнейшая канцерогенная трансформация. Феномен индукции генотоксических эффектов в клетках, находящихся рядом с клетками-мишенями, подвергавшихся облучению, получило название «эффекта свидетеля» (ЭС) [1]. ЭС наблюдается не только при облучении клеток целиком, но даже и при облучении микропучком только цитоплазмы (не затрагивая ядро). Важнейшими мишенями радиационного повреждения в цитоплазме становятся именно митохондрии. Это подтверждается многими исследованиями. Так, ЭС затормаживается в нормальных клетках при введении в среду их инкубации ингибиторов митохондриальных функций. Частота мутаций яДНК, при облучении цитоплазмы клеток микропучком альфа-частиц, значительно выше, чем частота мутаций, выявляемых при облучении ядер тех же клеток. Облучение цитоплазмы клеток дикого типа (ρ^+ клетках) ИИ с высокими ЛПЭ индуцировало ДР и окислительные повреждения яДНК, тогда как в клетках (ρ^0 клетках), лишенных мтДНК, этих повреждений яДНК не было – в них не функционировали процессы окислительного фосфорилирования и генерации активных форм кислорода и азота (АФК/А) [2]. Развитие исследований по данному направлению, возможно, также позволит понять механизмы абскопальных эффектов, возникающих в процессе радиотерапии опухолей.

Радиационное повреждение мтДНК, отсутствие ее эффективной репарации и нарушение функций митохондрий с повышенной генерацией АФК/А оказывают влияние на пострadiационное развитие целого комплекса эффектов на уровне клеток и всего организма млекопитающих. Нарушаются биоэнергетические, биосинтетические и сигнальные процессы в митохондриях. Изменение экспрессии мутантных генов мтДНК с синтезом дефектных белков, кодируемых ими, приводит к пертурбации системы цепи переноса электронов и синтеза АТФ. Это приводит к «перепроизводству» АФК/А, к усилению окислительного стресса, который способствует дальнейшему повреждению мтДНК и дисфункции митохондрий – таким образом формируются «порочные круги» на длительный пострadiационный период [3,4].

Возникновение хронического повышенного окислительного стресса, обусловленного АФК/А, является важнейшим индуктором нестабильности генома (НСГ).

В клетках тканей человека НСГ может иметь катастрофические последствия для развития многостадийного механизма радиационного канцерогенеза, а также является фактором многих нейродегенеративных и других патологий. НСГ, регистрируемая в клетках тканей пациентов после радиотерапии опухолей, рассматривается как важнейшая стадия развития отдаленных последствий радиационного воздействия [5].

Традиционно, для снижения АФК/А, используются антиоксиданты. В литературе представлено большое количество таких соединений, способных снижать повреждения клеток и многоклеточных организмов. Тем не менее, лицензии для их клинического применения получены только на несколько препаратов. Поскольку, основным внутриклеточным источником АФК/А (90%) являются митохондрии, препараты указанных классов имеют ограниченный доступ в эти органеллы, для подавления повышенного уровня окислительного стресса в облученных клетках. Многие соединения не способны преодолевать барьер внутренней митохондриальной мембраны.

Амифостин, наиболее эффективный радиопротектор, созданный по программе радиозащитных средств армии США (один из 4400 соединений), является препаратом, рекомендованным к клиническому применению. Исключительность амифостина заключается в том, что после отщепления от него фосфатной группы (щелочной фосфатазой мембраны) он приобретает способность переходить в митохондрии.

В последнее время разработан новый подход снижения радиационных повреждений, основанный на использовании митохондриально направленных антиоксидантов. Созданы десятки препаратов, которые проявляют повышенные радиопротекторные и радиомитигаторные свойства. Радиопротекторы, которые ранее считались недостаточно эффективными, при их конъюгации с трифенилфосфонием (ТФФ) способны преодолевать мембранный барьер - проникать в митохондрии и подавлять повышенный окислительный стресс [6].

Наряду с этим, имеются соединения, способные преодолевать мембранный барьер митохондрий и без привязки к ТФФ. К таким соединениям относится мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин «гормон сна»), который представляет значительный интерес как антиоксидант, снижающий эффекты воздействия различных токсических факторов, включая воздействия ИИ. Мелатонин является древним антиоксидантом, который является защитником ДНК от окисления.

Мелатонин цианобактерий, которые существовали на Земле миллиарды лет тому назад, содержится и в клетках человека. Согласно эндосимбиотической теории (происхождения митохондрий), древние бактерии превратились в митохондрии эукариот. Они сохранили способность синтезировать мелатонин. Таким образом, мелатонин не только поглощается митохондриями, но и продуцируется этими органеллами. Мелатонин можно рассматривать как природный, митохондриально нацеленный, мощный антиоксидант. У позвоночных мелатонин является основным продуктом эпифиза, что объясняет его увеличение в сыворотке крови во время темной фазы суток, но также он вырабатывается многими другими органами и типами клеток. Мелатонин содержится в одноклеточных организмах, грибах, растениях и во всех клетках животных и человека.

Согласно нашим наблюдениям, введение мелатонина мышам, за 10 мин до их облучения и через 10 мин после облучения летальными дозами рентгеновских лучей, оказывает достаточно выраженные эффекты повышения их выживаемости. Мелатонин способен защищать ДНК и другие клеточные макромолекулы от возникновения повреждений, вызываемых эндогенными АФК/А, активирует экспрессию антиоксидантных ферментов и стимулирует активность репарационных систем. Мелатонин снижает окислительный стресс и воспалительные процессы во всех тканях

млекопитающих и оказывает антиканцерогенное, геропротекторное, нейропротекторное и иммуномодулирующее действие [7,8].

В ряде клинических публикаций указывается, что введение мелатонина пациентам, отдельно или в сочетании с традиционной лучевой терапией, приводит к благоприятным эффектам и снижению токсичности при лечении различных видов рака [9,10]. В этих работах рассматривается возможность использования мелатонина в качестве радиопротектора для защиты и нормальных тканей в процессе радиотерапии опухолей. Установлена способность мелатонина подавлять пролиферацию различных раковых клеток и модулировать экспрессию мембранных рецепторов в этих клетках, тем самым, снижая агрессивность опухоли к метастазированию [11,12].

Использование мелатонина в процессе радиотерапии оказывает выраженное антиангиогенное действие посредством снижения экспрессии генов, вовлеченных в развитие ангиогенеза. Результаты многих исследований также показывают, что мелатонин является полезным препаратом для использования в качестве адьюванта при лучевой терапии опухолей.

Однако в настоящее время проведены только ограниченные исследования по выявлению защитного действия мелатонина на нормальные ткани, при проведении радиотерапии опухолей с использованием ИИ с высокой ЛПЭ.

Таким образом, мощный радиозащитный эффект мелатонина, низкая токсичность, способность подавлять митохондриальную дисфункцию, способность проникать в митохондрии различных типов клеток - является важной характеристикой данного соединения для его использования в качестве средства, снижающего повреждение нормальных близлежащих тканей при проведении радиотерапии опухолей.

Цитированная литература:

1. Little JB, Lauriston S. Taylor lecture: nontargeted effects of radiation: implications for low-dose exposures. *Health Phys* 91: 416–426, 2006
2. Ghita M. et al. Microbeam evolution: from single cell irradiation to pre-clinical studies. *Int J Radiat Biol.* 2018, 94(8):708-718.
3. Azzam EI. et al. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters.* 2012; 327, 48-60.
4. Gaziev AI. et al. Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age. *Biogerontology* (2014) 15:417–438.
5. Moon JJ. et al. Role of genomic instability in human carcinogenesis. *Exp Biol Med* (Maywood). 2019, 13: doi.org/10.1177/1535370219826031
6. Zielonka J. et al. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem Rev.* 2017, 117, 10043–10120
7. Galano A. et al. Melatonin: A Versatile Protector against Oxidative DNA Damage. *Molecules* 2018, 23, 530; P 1-36
8. Farhood B. et al. Melatonin and cancer: From the promotion of genomic stability to use in cancer treatment. *J Cell Physiol.* 2019, 234, 5613-5627.
9. Tarocco A. et al. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death Dis.* 2019, 10, 317. doi: 10.1038/s4141
10. González-González A. et al. Melatonin Enhances the Usefulness of Ionizing Radiation: Involving the Regulation of Different Steps of the Angiogenic Process. *Front Physiol.* 2019,10, 879. doi: 10.3389/fphys.
11. Chao CC. et al. Melatonin suppresses lung cancer metastasis by inhibition of epithelial-mesenchymal transition through targeting to Twist. *Clin Sci (Lond).* 2019, 133, 709-722.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕКТРА НЕЙТРОНОВ ПРИ РАБОТЕ МЕДИЦИНСКОГО УСКОРИТЕЛЯ ЭЛЕКТРОНОВ

Ганцовский П.П.¹, Желтоножская М.В.², Комаров Ю.А.¹, Лыкова Е.Н.², Цовьянов А.Г.¹,
А.П. Черняев²

¹ФГБУ ГНЦ ФМБЦ имени А.И. Бурназяна ФМБА России, лаборатория радиационно-гигиенических исследований, г. Москва, ²Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра физики ускорителей и радиационной медицины, г. Москва,
e-mail: iv-kate@yandex.ru

Резюме. В настоящее время при планировании лучевого лечения чаще всего выбор падает на использование пучков тормозных фотонов, генерируемых линейным ускорителем с энергиями от 6 до 20 МэВ. Однако, высокоэнергетические линейные ускорители, работающие на энергиях свыше 8 МэВ, могут генерировать потоки вторичных нейтронов при взаимодействии с элементами ускорителя и конструкционными материалами лечебного помещения

В настоящей работе определялся спектр вторичных нейтронов с помощью нейтронного дозиметра-спектрометра ДНС-01 на линейном медицинском ускорителе с граничной энергией тормозных гамма-квантов 20 МэВ. В качестве детектирующей мишени использовался естественный тантал ¹⁸¹Ta. По данным эксперимента была рассчитана активность ¹⁸⁰Ta, которая составила $10\,055 \pm 101$ Бк и активности ¹⁸²Ta для «голой» фольги, $(20,72 \pm 0,41)$ Бк для замедлителя диаметром 70 мм, $(45,94 \pm 0,57)$ Бк для замедлителя диаметром 120 мм, $(37,74 \pm 0,50)$ Бк для замедлителя диаметром 200 мм и $(15,41 \pm 0,25)$ Бк для замедлителя диаметром 300 мм.

Ключевые слова: нейтроны, активация, ускорители, медицинская физика, лучевая терапия

DETERMINATION OF THE NEUTRON SPECTRUM AT THE WORK OF THE MEDICAL ELECTRON ACCELERATOR

Gansovsky P.P.¹, Zheltonozhskaya M.V.², Komarov Yu.A.¹,
Lykova E. N.², Tsovijanov A.G.¹, Chernyaev A.P.²

¹A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia, ²Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University,
e-mail: iv-kate@yandex.ru

Summary. At present, when planning radiation treatment, the choice most often falls on the use of bremsstrahlung photons generated by a linear accelerator with energies from 6 to 20 MeV. However, high-energy linear accelerators operating at energies above 8 MeV can generate secondary neutron fluxes when interacting with accelerator elements and structural materials of the treatment room

In this work, the spectrum of secondary neutrons was determined using Bonner spheres on a linear medical accelerator with a limiting energy of inhibitory gamma rays of 20 MeV. The natural tantalum ¹⁸¹Ta was used as a detecting target. According to the experiment, the ¹⁸⁰Ta activity was calculated, which amounted to $10,055 \pm 101$ Bq and ¹⁸²Ta activity for the “bare” foil, (20.72 ± 0.41) Bq for the moderator with a diameter of 70 mm, (45.94 ± 0.57) Bq for a moderator with a diameter of 120 mm, (37.74 ± 0.50) Bq for a moderator with a diameter of 200 mm and (15.41 ± 0.25) Bq for a moderator with a diameter of 300 mm.

Key words: neutrons, activation, accelerators, medical physics, radiotherapy

Радиотерапия занимает одно из главных мест в лечении онкологических заболеваний различных тканей и органов. Данная методика позволяет повысить выживаемость пациентов, а также облегчить их состояние.

Однако лучевая терапия имеет и ряд недостатков такие как постлучевые

осложнения и лучевые реакции. Для проведения безопасной лучевой терапии физики, радиологи разрабатывают новые устройства и способы облучения, которые позволили бы снизить лучевую нагрузку на здоровые ткани и вероятность побочных эффектов.

В настоящее время при планировании лучевого лечения чаще всего выбор падает на использование пучков тормозных фотонов, генерируемых линейным ускорителем с энергиями от 6 до 20 МэВ. Однако, высокоэнергетические линейные ускорители, работающие на энергиях свыше 8 МэВ, могут генерировать потоки вторичных нейтронов при взаимодействии с элементами ускорителя и конструкционными материалами лечебного помещения [1-3]. Порог реакций зависят от атомного номера ядер мишени. В головке ускорителя, конструируемой из металлов с высоким атомным номером, образуется интенсивный поток фотонейтронов из реакции (γ, n). Кроме того, вещества с большим атомным номером Z , находящиеся в головке ускорителя, имеют малое сечение поглощения генерируемых нейтронов различных энергий [3-7]. Эти нейтроны достигают больного, формируя дозу, не учитываемую современными системами планирования.

В настоящей работе определялся спектр вторичных нейтронов с помощью нейтронного дозиметра-спектрометра ДНС-01 (сферы Боннера) на линейном медицинском ускорителе.

Во время проведения эксперимента ускоритель работал при максимальной энергии тормозного излучения 20 МэВ, был ориентирован вертикально вниз на пол с углом поворота гантри и коллиматора равным 0° . Использовалась максимальная установленная мощность дозы равная 6 Гр/мин. Размер поля для всех измерений был максимальным и составил $40 \times 40 \text{ см}^2$. На кушетке на расстоянии 100 см от источника был установлен спектрометр, который состоял из танталовых активационных детекторов, размещаемых внутри сферических полиэтиленовых замедлителей диаметрами 70, 120, 200 и 300 мм. Для измерения флюенса нейтронов использовалась также голая танталовая фольга. В качестве детектирующей мишени использовался естественный тантал ^{181}Ta . Танталовые детекторы имели квадратную форму $10 \times 10 \text{ мм}^2$, весом 1.2 г и толщиной 350 мкр. Время облучения каждой мишени из танталовой фольги составляло 17.7 минуты.

Облученные мишени тантала измерялись на полупроводниковом спектрометре с детектором из сверхчистого германия.

В измеренных спектрах надежно выделялись гамма-кванты радионуклида ^{180}Ta с периодом полураспада $T_{1/2}=8,15$ часов, образующиеся в (γ, n)-реакции и радионуклида ^{182}Ta с периодом полураспада $T_{1/2}=115$ дней, образующихся в (n, γ)-реакции. Активность ^{180}Ta составила $10\,055 \pm 101$ Бк. Активность ^{182}Ta составила $(3,796 \pm 0,180)$ Бк для «голой» фольги, $(20,72 \pm 0,41)$ Бк для замедлителя диаметром 70 мм, $(45,94 \pm 0,57)$ Бк для замедлителя диаметром 120 мм, $(37,74 \pm 0,50)$ Бк для замедлителя диаметром 200 мм и $(15,41 \pm 0,25)$ Бк для замедлителя диаметром 300 мм.

Полученные результаты обсуждаются.

Список литературы

1. Carrillo HR, Almaraz BH, Dávila VM, Hernández AO. Neutron spectrum and doses in a 18 MV Linac. J Radioanal Nucl Chem 2010; 283:261-5.
2. Zanini A, Durisi E, Fasolo F, Ongaro C, et al. Monte Carlo simulation of the photoneutron field in linac radiotherapy treatments with different collimation systems. PhysMed Biol 2004; 49:571-82.
3. Pena J, Franco L, Gómez F, Iglesias A, Pardo J, Pombar M. Monte Carlo study of Siemens PRIMUS photoneutron production. Phys Med Biol 2005; 50:5921-33.

МОДИФИКАЦИЯ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ИНГИБИТОРОМ ГЛИКОЛИЗА ГЛЮКОЗАМИНОМ D.

Н.Я. Гильяно, Ф.М. Ибатуллин, М.М. Дуботолова, Л.А. Носкин, С.И. Степанов.

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», giliano@omrb.pnpi.spb.ru;

Резюме. В экспериментах на 3-х линиях клеток человека исследовали роль цитостатического фактора в цитотоксическом эффекте гамма облучения до и после обработки клеток ингибитором гликолиза глюкозамином D. Показано, что обработка клеток глюкозамина D приводила к аккумуляции клеток в G₁ фазе клеточного цикла. Облучение клеток гамма лучами блокировало клетки в G₂/M клеточного цикла вне зависимости от типа клеток. Предрадиационная инкубация клеток глюкозамином D селективно усиливала радиационно-индуцированный апоптоз в опухолевых клетках (HeLaG63, Hep G2), не влияя на неопухолевые клетки (ECV304).

Ключевые слова: глюкозамин D, гамма лучи; HeLaG63, Hep G2, ECV304; МТТ-метод; проточная цитометрия; клеточный цикл; апоптоз.

MODIFICATION OF THE SENSITIVITY OF TUMOR CELLS BY THE GLYCOLYTIC INHIBITOR GLUCOSAMINE D.

Giliano N.Y., Ibatullin F.M., Dubotolova M.M., Noskin L.A., Stepanov S.I.,

B.P. Konstantinov Petersburg Institute of Nuclear Physics of the Kurchatov Institute National Research Center, giliano@omrb.pnpi.spb.ru

Summary. In experiments on 3 human cell lines, the role of the cytostatic factor in the cytotoxic effect of gamma irradiation before and after treatment of cells with glycosylation inhibitor glucosamine D was studied. It was shown that treatment of glucosamine D cells led to cell accumulation in the G₁ phase of the cell cycle. Irradiation of gamma ray cells blocked cells in the G₂ / M cell cycle, regardless of cell type. Pre-radiation incubation of cells with glucosamine D selectively enhanced radiation-induced apoptosis in tumor cells (HeLaG63, Hep G2) without affecting non-tumor cells (ECV304).

Key words: glucosamine D, gamma rays; HeLaG63, Hep G2, ECV304; MTT-test; flow cytometry; cell cycle; apoptosis.

Ингибирование пролиферации опухолевых клеток является одной из главных задач химиотерапии. Снижение пролиферативной активности сопровождается блокированием прогрессии клеток по циклу и последующей гибелью клеток. Повышенная зависимость опухолевых клеток от глюкозы, предполагает что аналоги глюкозы могут быть использованы для модификации радиочувствительности опухолевых клеток. Показано, что 2-deoxy-D-glucose (2-DG) селективно усиливает радиационно-индуцированные повреждения в опухолевых клетках, не влияя на нормальные клетки. [1, 2, 3]. Ранее нами была показана повышенная чувствительность клеток карциномы шейки матки (линия HeLa G 63) к двум аналогам глюкозы 2-DG и глюкозамину D. Оба аналога являются ингибиторами гексокиназы и при низких концентрациях включали в клетках различные чек-пойнты: глюкозамин D ингибировал прогрессию клеток из G₁ в S-фазу, а 2-DG блокировала клетки в G₂/M. Сочетанная обработка глюкозамином D и 2-DG индуцировала большую гибель опухолевых

клеток, чем их раздельное воздействие. Синергетический эффект регистрировался только для клеток карциномы [4].

Цель исследования. В данной работе мы попытались оценить роль цитостатического эффекта в модификации клеточной радиочувствительности опухолевых клеток ингибитором гликолиза глюкозамином D.

Материал и методы: Работа выполнена на клетках карциномы шейки матки (линия HeLa G 63), гепатокарциномы (линия Hep G2) и на эндотелиоцитах (линия ECV 304) человека. Облучение клеток гамма-лучами Co^{60} проводили на установке «Исследователь» ПИЯФ им. Б. П. Константинова. Мощность дозы 7Гр/мин. Морфологические изменения регистрировали на световом микроскопе «Motic» или прижизненно окрашивали DAPI или Хестом и анализировали на флуоресцентном микроскопе EVOS. С помощью проточно-цитометрического анализа оценивали распределение клеток по содержанию ДНК (по фазам клеточного цикла) и уровень апоптотических клеток (суб-G₁популяция). Параллельно жизнеспособность клеток оценивалась с помощью МТТ – теста.

Результаты : Показано, что 24 часовая обработка клеток 3мМ глюкозамина D приводила к аккумуляции клеток в G₁ фазе клеточного цикла. Облучение клеток гамма лучами испускаемыми при распаде Co^{60} в дозе 7 Гр приводило к аккумуляции клеток в G₂/M вне зависимости от типа клеток. Уровень клеток с содержанием ДНК < 2с (клетки с фрагментированными ядрами) увеличивался незначительно при фиксации клеток через 24 часов после облучения. Увеличение временного интервала между облучением и фиксацией клеток до 48 часов приводило к увеличению доли клеток с содержанием ДНК < 2с , при этом снижалась доля клеток аккумуляированных в G₂/M. Быстрее всех выходили из G₂/M блока клетки линии Hep G2, медленнее клетки линии ECV 304, даже после 48 часов после облучения 67% клеток находились в G₂/M фазах. При увеличении временного интервала до 72 часов регистрируется увеличение гибели клеток. При морфологическом анализе регистрируется не только фрагментация ядерного материала полиплоидных клеток, но и вакуолизация цитоплазмы, нарушение целостности клеточной мембраны,

Результаты сравнительного анализа индукции апоптотической гибели клеток при раздельном и сочетанном воздействии глюкозамином D и гамма-лучами Co^{60} выявили большую чувствительность клеток линии HeLa G63 и Hep G2 к обработке глюкозамином, чем клетки линии ECV 304. Радиочувствительность клеточных линий, оцененная по уровню популяции клеток с содержанием ДНК < 2с, для клеток линии HeLa G63 и ECV 304 была примерно одинаковой, что подтверждает ранее опубликованные данные, в которых радиочувствительность этих клеточных линий оценивалась по уровню радиационно-индуцированных хромосомных повреждений. [5]. Сочетанное воздействие глюкозамином D и гамма-лучами Co^{60} в вдвое и втрое увеличивало эффективность раздельных обработок клеток карциномы линии HeLa G63 и Hep G2 иными словами, для этих клеток регистрируется существенный синергетический эффект, чего не наблюдается для линии ECV 304.

Выводы. Показана, селективная радиосенсибилизация опухолевых клеток глюкозамином D за счет необратимого блокирования клеток карциномы в G₁ фазе клеточного цикла. При этом стоит отметить, что глюкозамин D не только увеличивает эффективность гамма-облучения, но сам проявляет селективную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток. Предполагается, что глюкозамином D избирательно усиливает радиационное повреждение раковых клеток, ингибируя энергетически (АТФ) зависимые пострадиационные процессы репарации ДНК [6]. При этом взаимосвязь энергетического метаболизма и радиобиологических ответов является очень сложной по своей природе и требует дальнейших исследований.

Список литературы.

1. Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, et al. . [Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme.](#) Strahlenther Onkol. 2005 v.181, n.8:p.507-14.
2. [Dwarakanath BS, Singh D, Banerji AK, et al., Clinical studies for improving radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: present status and future prospects. J Cancer Res Ther. 2009 ;5 Suppl 1:S21-6.](#)
3. [Coleman MC1, Asbury CR, Daniels D, et al..2-deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. Free Radic Biol Med. 2008 v.44, n. 3,;p.322-331.](#)
4. Гильяно Н.Я., Носкин Л.А., Журишкина Е.В., и др. Комбинация низких доз глюкозамина и 2-DG усиливает цитотоксический эффект в опухолевых клетках человека в культуре. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2019. Том 63, No 2, с.41-49.
5. Гильяно Н.Я., Бондарев Г.Н. Коневега Л.В. и др. Модификация клеточной радиочувствительности ингибиторами NO-синтазы. Радиобиология. Радиоэкология. 2005. т.45, № 1, стр.63-70.
6. Dwarkanath BS, Zolzer F, Chandana S, et al. Heterogeneity in 2-deoxy-D-glucose-induced modifications in energetics and radiation responses of human tumor cell lines. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001 v.50 n. 4, p.105110-61

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМОВ ХИМИОЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ С УЧЁТОМ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛАТИНЫ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ

Д.А. Гиневский, П.В. Изhevский, И.Н. Шейно

Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им.А.И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва
e-mail: izhevski@rambler.ru

Резюме. Предлагается математическая модель оптимизации лучевой терапии рака за счёт введения радиомодифицирующего агента. Разработана модель пространственно-временного распределения радиомодифицирующего агента - химиотерапевтического препарата с заданными физико-химическими свойствами на тканевом и клеточном уровнях организации биологической ткани. Модель может быть адаптирована для определения 3D кинетики наночастиц, а также препаратов для диагностики или терапии злокачественных новообразований.

Ключевые слова: облучение, химиотерапия, опухоли, платина, распределение в клетке, математическая модель.

OPTIMIZATION OF CHEMICAL TREATMENT MODES TAKING INTO ACCOUNT PLATINUM DISTRIBUTION IN TUMOR TISSUE

Ginevskiy D. A., Izhevskiy P. V., Sheino I.N.

State Research Center of Russian Federation – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow
e-mail: izhevski@rambler.ru

Summary. A mathematical model is proposed for optimizing radiation therapy for cancer by introducing a radio modifying agent. A model was developed for the spatiotemporal distribution of a radio modifying agent, a chemotherapeutic drug with specific physicochemical properties at the tissue and cellular levels of biological tissue organization. The model can be adapted to determine the 3D kinetics of nanoparticles, as well as drugs for the diagnosis or treatment of malignant neoplasms.

Key words: irradiation, chemotherapy, tumors, platinum, cell distribution, mathematical model

Перспективным направлением оптимизации лучевой терапии (ЛТ) рака является «биофизическое нацеливание» высокоэнергетических излучений за счёт введения радиомодифицирующего агента (РМА) - элемента с высоким Z (атомным номером). Проведение ЛТ в момент их наибольшей концентрации в клетке позволяет увеличить вероятность полного уничтожения опухоли при минимальном поражении нормальных тканей. Эффект достигается за счёт генерирования каскада вторичных электронов на орбиталях элементов с высоким Z . Вторичные электроны имеют короткую длину пробега, но достаточную энергию для разрушения ДНК и мембран опухолевой клетки. Наиболее перспективными радиомодифицирующими агентами являются широко применяемые при химиотерапии опухолей препараты платины (цисплатин, карбоплатин и др.), а также наночастицы металлов, проходящие в настоящее время 1-ю фазу клинических испытаний [1].

При оптимизации режимов химиолучевой терапии злокачественных новообразований дозовое распределение следует распределению РМА в ткани [2]. Следовательно, информация о распределении РМА в клетках и тканях, равно как во

всём организме, необходима для расчета дозовых нагрузок. Современные модели фармакокинетики лекарственных средств описывают процессы происходящие в условных «камерах» (кровь – орган – опухолевая ткань), но не позволяют описать пространственное распределение препарата как внутри опухоли, так и на границе «опухолевая / здоровая» ткань.

Цель исследования: разработка трёхмерной математической модели процесса пространственного распределения РМА в тканях организма в зависимости от исходной концентрации препарата в крови.

Метод моделирования предполагает представление биологической структуры в виде случайно неоднородной среды, в которой происходит процесс рассасывания РМА. При этом параметры, которые невозможно строго определить в экспериментах на культурах клеток или на животных (в силу большого количества влияющих на них факторов), приняты как величины подчиняющиеся законам несвязанных между собой случайных процессов [3].

Параметрами модели являются частная реализация случайного процесса, построенного на базе превалирующего биологического процесса, значения которого могут быть определены экспериментально. Например, константы Михаэлиса, максимальные скорости ферментативных биохимических реакций, удельная объемная скорость пиноцитоза и т.д. При этом коммулянтами этого процесса могут служить структуры или структурные нарушения, различные биофизические процессы. Например, плотность кровеносных сосудов, образование канальцев в кровеносных капиллярах, клеточная плотность, извилистость межклеточной среды и т.д.

Результаты: разработана математическая 3D модель процесса кинетики распределения РМА в тканях организма в зависимости от исходной концентрации препарата в крови. Проведен *in silico* эксперимент на основании данных о концентрации цисплатина при условии его внутривенного капельного введения онкологическому больному. Решение системы уравнений со случайными коэффициентами, позволило получить оценки динамики распределения цисплатина в объёме от 1 см³ содержащем клетки опухоли и здоровых тканей.

Заключение: Разработанная модель представляется единственно возможной для получения необходимой информации по пространственно-временному распределению химиотерапевтических препаратов с заданными физико-химическими свойствами на тканевом и клеточном уровнях организации живого. Модель может быть адаптирована для определения кинетики наночастиц, а также препаратов предлагаемых для диагностики или терапии злокачественных новообразований.

Список литературы

1. Schermann R, Vogel S, Ebel K, Bald I / The Physico-Chemical Basis of DNA Radiosensitization: Implications for Cancer Radiation Therapy.// Chem. Eur. J., 2018, v. 24, pp. 10271 – 10279, <https://doi.org/10.1002/chem.201800804>
2. Sheino I.N. Dose-supplementary therapy of malignant tumors. // Advances in Neutron Capture Therapy 2006. Proceedings of ICNCT-12. /Edited by Y. Nakagawa, T. Kobayashi and H. Fukuda. October 9-13, 2006 Takamatsu, Kagawa, Japan. p. 531-534.
3. Кляцкин В.И. Стохастические уравнения и волны в случайно-неоднородных средах. "Наука", 1980.–335 с.

ОЦЕНКА НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА У БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ПО ЧАСТОТЕ КЛЕТОК С ПОЛИСОМИЕЙ ХРОМОСОМ 7 И 11 ПОСЛЕ ГАММА-ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ.

*Е.В. Голуб, Г.Ф. Михайлова, Т.Г. Шкаврова, В.В.Цепенко, В.В. Польшкин,
Ю.А. Панасейкин, П.А. Исаев*

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск, Россия, e-mail: mgr@mrrc.obninsk.ru

Резюме. В клетках опухоли слизистой оболочки полости рта изучена до лечения и после γ -лучевой терапии частота клеток с полисомией хромосом 7 и 11, которая свидетельствует о хромосомной нестабильности (ХрН). Степень ХрН оценивалась при частоте клеток с полисомией <20% (ХрН1), \geq 20% (ХрН2) и \geq 40% (ХрН3). Анализ индивидуального ответа на γ -лучевую терапию показал снижение частоты клеток с полисомией хромосом в 89% образцах и уменьшение во всех образцах степени хромосомной нестабильности генома до ХрН1.

Ключевые слова: нестабильность генома, полисомия, хромосомы, FISH, радиотерапия

EVALUATION OF GENOMA INSTABILITY IN PATIENTS WITH MUSCULAR CANCER OF THE ORAL CAVITY IN THE FREQUENCY OF CELLS WITH POLYSOMY CHROMOSE 7 AND 11 AFTER GAMMA-RAY TREATMENT.

E.V.Golub, G.F.Mikhailova, T.G.Shkavrova, V.V.Polkin, Y.A.Panaseikin, P.A.Isaev

Medical Radiology Research Center by A. F. Tsyb — branch of the federal state budgetary institution "National Medical Research Center of Radiology" of the Ministry of Health of Russia, Obninsk, Russia, e-mail: mgr@mrrc.obninsk.ru

Summary. Values of cells with chromosomes 7 and 11 polysomy showing chromosomal instability (CI) were studied in tumor cells of oral squamous carcinoma patients before γ -radiotherapy and after treatment. The range of CI was estimated in cells with levels of polysomy <20% (CI1), \geq 20% (CI2) and \geq 40% (CI3) respectively. The analysis of individual response to γ -therapy showed the decreasing of the values of cells with chromosomal polysomy in 89% of samples and reducing the level of CI up to CI1 in all samples.

Key words: chromosomal instability, polysomy, chromosomes, FISH, radiotherapy

В большинстве солидных опухолей, в том числе в опухолях слизистой оболочки полости рта (СОПР), наблюдается хромосомная нестабильность (ХрН), которая проявляется в потере, а также увеличении числа целых хромосом или их сегментов. Результаты исследований, проведенных ранее [1, 2, 3] свидетельствуют о хромосомной нестабильности как доминирующем событии в канцерогенезе СОПР. Более того, степень хромосомной нестабильности может служить предиктором рецидива и плохого прогноза для пациента со злокачественными заболеваниями разной локализации. В случаях рака СОПР [4], рака ротоглотки [5], немелкоклеточного рака легких [6] и в лимфомах [7] прогрессия от низкой до высокой стадии и метастазов в лимфоузлы сопровождается увеличением ploидности хромосом 3, 7, 8, 9, 10, 11, 17. Авторы [4] выявили корреляцию высокой степени ХрН с плохим прогнозом, что подтверждено при одномерном ($p = 0,003$) и мультивариантном ($p = 0,041$) анализе. Оценка ХрН проводится различными методами, в том числе PCR, CGH, проточной цитометрией, кариотипированием. Однако для практического применения эти методы трудоемки.

Метод интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) позволяет быстро и легко определять изменение числа хромосом в клетках даже в операционной ткани маленького размера.

Цель исследования: изучение динамики частоты клеток с полисомией хромосом 7 и 11 в образцах рака СОПР до начала лечения пациентов и после первой и второй суммарной очаговой дозы (СОД) γ -терапии.

Материалы и методы: исследовали 10 образцов СОПР контрольной группы и образцы опухоли 18 больных раком слизистой оболочки полости рта до и после γ -лучевой терапии. Анализ проводили методом интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) с использованием ДНК проб на центромеры хромосом 7 и 11 (EGFR/CEP7 и CCND1/CEP11; Kreatech). Диапазон первой СОД составлял 18–28,8 Гр. Диапазон второй СОД составлял 36 – 54 Гр. Лучевая терапия проводилась на установке «ТЕРАБАЛ». Полисомия хромосом определялась как повышенное число сигналов CEP7 и CEP11 в ядре клетки. В группу были включены образцы опухоли различной стадии и места локализации. Оценку достоверности различий проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Степень хромосомной нестабильности в исследованных образцах оценивали по суммарной частоте клеток с полисомией CEP7 и CEP11 как XpH1 при <20%, XpH2 – при суммарной частоте клеток с полисомией обеих хромосом $\geq 20\%$ и XpH3 – при суммарной частоте клеток с полисомией обеих хромосом $\geq 40\%$ (4).

Результаты: в контрольной группе частота клеток с полисомией хромосом 7 и 11 в среднем составляла $0,5 \pm 0,2\%$. В исследованных 18 опухолевых образцах выявлена повышенная частота клеток с полисомией исследованных хромосом, что свидетельствует о хромосомной нестабильности клеток рака СОПР. В исследованной группе наблюдалось по 6 образцов с хромосомной нестабильностью XpH1, XpH2 и XpH3. Диапазоны варибельности частоты клеток с повышенным числом CEP7 и CEP11 составляли 1,5% – 15,0% (XpH1), 21,5% – 30,5% (XpH2) и 43,0% – 61,8% (XpH3). Во всех исследованных образцах суммарная частота клеток с полисомией хромосом 7 и 11 превышала контрольный уровень ($p < 0,05$).

После γ -лучевой терапии первой СОД в 12 (66,7%) образцах из 18 наблюдалось снижение частоты клеток с полисомией исследованных хромосом по сравнению с их уровнем до γ -лучевой терапии. Из них в 9 (75%) образцах снижение было статистически значимо ($p < 0,05$). При этом уменьшилась нестабильность генома в 10 образцах со степени XpH2 и XpH3 до XpH1. Однако во всех случаях частота клеток с полисомией хромосом 7 и 11 оставалась выше контрольного уровня ($p < 0,05$). В остальных 6 образцах (33,3%), наоборот, частота клеток с полисомией хромосом 7 и 11 повысилась. Из них в 5 образцах наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) увеличение частоты клеток с этим нарушением. При этом только в одном из этих 6 образцов возросла степень хромосомной нестабильности с XpH1 до XpH2. Еще в одном образце не выявлено изменений частоты клеток с повышенным числом CEP7 и CEP11 по сравнению с их уровнем до γ -лучевой терапии.

После проведения γ -лучевой терапии второй СОД уже в 16 образцах отмечалось снижение частоты клеток с повышенным числом CEP7 и CEP11 по сравнению с их уровнем до γ -лучевой терапии. В 15 случаях оно было статистически значимо ($p < 0,05$), но только в 2-х образцах частота их снизилась до контрольного уровня ($p < 0,05$). В остальных 2-х образцах из 18 исследованных частота клеток с полисомией, наоборот, достоверно возросла ($p < 0,05$) по отношению к их уровню до лечения. Таким образом, после завершения γ -лучевой терапии диапазон варибельности клеток с исследованным нарушением генома во всех образцах соответствовал низкой степени хромосомной нестабильности (XpH1).

Обсуждение: многочисленные исследования показали, что нестабильность генома приводит к накоплению генетических нарушений, которые связаны с плохим прогнозом у онкологических больных. Это может быть потеря или увеличение числа целых хромосом или их частей при клеточном делении. Такой дисбаланс числа хромосом (анеуплоидия) вызывает изменения в экспрессии многих онкогенов и генов опухолевой супрессии, что в свою очередь и формирует злокачественный фенотип клеток. В нашем исследовании мы провели оценку динамики частоты клеток с нестабильным геномом при γ -лучевой терапии. Полученные результаты показали, что, несмотря на индивидуальные колебания частоты клеток с полисомией хромосом 7 и 11 в процессе радиотерапии, в целом наблюдается уменьшение их числа. Это свидетельствует о снижении нестабильности генома в процессе лечения. Однако, в большинстве случаев частота клеток с нарушением генома остается достоверно выше контрольного уровня ($p < 0,05$), что может быть показателем к повторной радио- или химиотерапии.

Выводы: метод I-FISH позволяет выявить нестабильность генома, которая потенциально может быть предиктором рецидивов и плохого прогноза для пациентов с раком СОПР. Поэтому необходимо наблюдение за молекулярно-цитогенетическими показателями в клетках СОПР в постклинический период.

Список литературы

1. Gollin S.M. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease // *Head Neck*. 2001. Vol. 23. P. 238-253.
2. Jin C., Jin Y., Wennerberg J. [et al]. Karyotypic heterogeneity and clonal evolution in squamous cell carcinomas of the head and neck // *Cancer Genet. Cytogenet.* 2002. V. 132. P. 85-96.
3. Reshmi S.C., Gollin S.M. Chromosomal instability in oral cancer cells // *J. Dent. Res.* 2005. V. 84. P. 107-117.
4. Hiroaki Sato, Narikazu Uzawa, Ken-Ichiro Takahashi [et al]. Prognostic utility of chromosomal instability detection by fluorescence in situ hybridization in fine-needle aspirates from oral squamous cell carcinomas // *BMC Cancer*. 2010. V. 10. P. 182-190.
5. Hardisson D., Marcos C.A., Bustamante A.S. [et al]. Numerical aberrations of chromosomes 8, 9, 11 and 17 in squamous cell carcinoma of the pharynx and larynx: a fluorescence in situ hybridization and DNA flow cytometric analysis of 50 cases // *Oral Oncol.* 2004. V. 40. P. 409-417.
6. Nakamura H., Saji H., Idiris A. [et al]. Chromosomal instability detected by fluorescence in situ hybridization in surgical specimens of non-small cell lung cancer is associated with poor survival // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. P. 2294-2299.
7. Garaway N.P., Thomas E., Khanna A. [et al]. Chromosomal abnormalities detected by multicolor fluorescence in situ hybridization in fine-needle aspirates from patients with small lymphocytic lymphoma are useful for predicting survival // *Cancer*. 2008. V. 114. P. 315-322.

**ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ:
ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ РАДИОМОДИФИКАТОРОВ И
СРЕДСТВ СОПРОВОЖДЕНИЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ**

А.Н. Гребенюк^{1,2}, В.Д. Гладких³

¹ ООО «Специальная и Медицинская Техника», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГУП «Научно-производственный центр «Фармзащита» ФМБА России,
Химки Московской обл., Россия

e-mail: grebenyuk@spmt.ru

Резюме. Проведена оценка отечественного рынка лекарственных препаратов, которые потенциально могут применяться в качестве радиомодификаторов и средств сопровождения лучевой терапии опухолей. Показано, что в РФ производятся современные радиосенсибилизаторы, радиопротекторы, радиомитигаторы, средства профилактики и купирования эметической реакции, средства лечения местных лучевых поражений кожи и слизистых оболочек, применение которых позволяет повысить эффективность лучевой терапии опухолей, провести профилактику и лечение осложнений.

Ключевые слова: лекарственный препарат, радиомодификатор, лучевая терапия, осложнения, лечение

**DOMESTIC DRUGS:
POSSIBILITIES OF APPLICATION AS RADIOMODIFIERS AND MEANS OF
SUPPORTING OF TUMOR RADIOTHERAPY**

A.N. Grebenyuk^{1,2}, V.D. Gladkikh³

¹ Special & Medical Equipment LLC, St. Petersburg, Russia

² St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia

³ Research and Production Center “Farmzaschita” of Federal Medical-Biological Agency of
Russia, Khimki, Russia

e-mail: grebenyuk@spmt.ru

Резюме. Assessment of the domestic market of drugs that could potentially be used as radiomodifiers and means of accompanying radiation therapy of tumors was carried out. It was shown that the Russian pharmaceutical enterprises produce modern radiosensitizers, radioprotectors, radiomitigants, means of prophylactic and threat of emetic reaction, means for treating of local radiation injuries of the skin and mucous membranes, the use of which can increase the effectiveness of radiation therapy for tumors, prevent and treat complications.

Key words: drug, radiomodifier, radiation therapy, complications, treatment.

В ходе лучевой терапии опухолей применяется широкий ряд лекарственных препаратов как повышающих эффективность проводимого лечения (радиосенсибилизаторы, цитостатики), так и предотвращающих или снижающих нежелательные побочные эффекты ионизирующих излучений [1, 2]. К сожалению, в реальной жизни подавляющую часть этих средств составляют зарубежные лекарственные препараты, что связано как с существующими протоколами лечения, так и с устоявшимися представлениями о низком качестве и, следовательно, малой эффективности отечественных лекарственных средств. Однако в последние годы усилиями российских ученых и фармацевтической промышленности был создан целый ряд лекарственных препаратов, применение которых могло бы оказаться полезным при проведении лучевой и химиолучевой терапии опухолей [3, 4, 5].

Цель исследования: оценка отечественного рынка лекарственных препаратов, которые потенциально могут применяться в качестве радиомодификаторов и средств сопровождения лучевой терапии опухолей.

Материал и методы. Материалами для исследования послужили данные Государственного реестра лекарственных средств РФ (<https://grls.rosminzdrav.ru/>) и сведения отечественных фармацевтических предприятий о реально производимых ими лекарственных препаратах. Изучение возможности применения отечественных лекарственных препаратов для повышения эффективности лучевой терапии опухолей, снижения числа побочных эффектов и профилактики осложнений проводили методами логического анализа и экспертных оценок.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что в ходе лучевой терапии опухолей потенциально могут использоваться лекарственные препараты из групп радиосенсибилизаторов, радиопротекторов, стимуляторов гемопоэза и иммуностимуляторов (радиомитигаторов), средств профилактики и купирования эметической реакции, средств профилактики и лечения местных лучевых поражений кожи и слизистых оболочек, средств симптоматической терапии. В качестве потенциального радиосенсибилизатора среди отечественных лекарственных средств может рассматриваться лишь метронидазол. Из числа радиопротекторов в РФ зарегистрирован только препарат Б-190, применение которого целесообразно как для защиты нормальных тканей от действия гамма- или рентгеновских лучей, но и для профилактики ранних и поздних проявлений местных лучевых поражений кожи, возникающих при лучевой терапии опухолей. Отечественные стимуляторы гемо- и иммунопоэза, перспективные для применения в ходе лучевой терапии, представлены беталейкином, дезоксинатом, а также препаратами гранулоцитарного и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующих факторов (лейкостим, нейтростим, неостим, экстимия). Средства профилактики и купирования эметической реакции, производимые в РФ, включают латран, гранисетрон, домперидон, метоклопрамид, трописетрон, этаперазин. Для лечения местных лучевых поражений кожи и слизистых оболочек, возникающих как осложнение проводимой лучевой терапии, могут использоваться перевязочные гидрогелевые, противоожоговые средства «Лиоксазин-СП», «Лиоксазин-Гель», другие местные противовоспалительные и стимулирующие репарацию средства, а также ряд лекарственных препаратов системного действия – глутоксим, моликсан и др. Наиболее обширную группу составляют средства симптоматической терапии, среди которых гемостатик амбен, серотонинэргический препарат динатон, антидепрессант кломипрамин и многие другие.

В докладе будет дана подробная характеристика вышеперечисленных групп препаратов и конкретных лекарственных средств, которые могут применяться в качестве радиомодификаторов и средств сопровождения лучевой терапии опухолей.

Заключение. Таким образом, отечественные фармацевтические предприятия производят значительное количество лекарственных препаратов, которые могут применяться для повышения эффективности лучевой терапии опухолей, снижения числа возникающих при ней побочных эффектов, профилактики и лечения осложнений.

Список литературы

1. Терапевтическая радиология: Национальное руководство / под ред. А.Д. Каприна, Ю.С. Маратынского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 704 с.
2. Гребенюк А.Н., Легеза В.И., Назаров В.Б., Тимошевский А.А. Медицинские средства профилактики и терапии радиационных поражений. СПб: Фолиант, 2011. 92 с.

3. Клиническая фармакология: Национальное руководство / под ред. Ю.Б. Белоусова, В.Г. Кукеса, В.К. Лепехина, В.И. Петрова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 976 с.
4. Состояние и перспективы развития средств профилактики и лечения радиационных поражений / под ред. В.Д. Гладких. М.: Комментарий, 2017. 304 с.
5. Гребенюк А.Н., Гладких В.Д. Современное состояние и перспективы разработки лекарственных средств для профилактики и ранней терапии радиационных поражений // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 2. С. 132-149.

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ОБЛУЧЕНИЯ В РАМКАХ РАЗРАБОТКИ
МЕТОДИКИ «СПАСИТЕЛЬНОЙ» ВНУТРИПРОСВЕТНОЙ
ВЫСОКОМОЩНОСТНОЙ БРАХИТЕРАПИИ РЕЦИДИВА РАКА ПИЩЕВОДА
ПОСЛЕ ПРОВЕДЁННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДОПУСТИМОЙ ГЛУБИНЫ ПРОРАСТАНИЯ**

*А.В. Демьянович, Д.Б. Санин, С.В. Гамаюнов, В.В. Мартынова, Н.Б. Борышева,
Л.Н. Титова, И.Н. Иванова, Магомедова А.Н.*

Медицинский Радиологический Научный Центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ
«Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ,
Обнинск, Россия, alyonadem1993@yandex.ru

Резюме. В рамках разработки нового метода лечения рецидива рака пищевода с применением высокоэнергетической брахитерапии, необходимо было установить допустимую глубину прорастания опухоли. Для решения этой задачи был разработан фантом, моделирующий ткани пищевода. На основе этого фантома были смоделированы различные размеры опухоли и проведена оценка дозовых нагрузок на критические органы и ткани. Полученные результаты легли в основу нового протокола лечения рецидива рака пищевода.

Ключевые слова: рак пищевода, высокоэнергетическая брахитерапия, дозиметрическое планирование, органы риска, рецидив.

**MODELING OF THE IRRADIATION PROCESS AS PART OF DEVELOPMENT OF
THE "SALVAGE" INTRALUMINAL HDR BRACHYTHERAPY OF ESOPHAGEAL
CANCER RECURRENCE AFTER RADIATION THERAPY**

*A.V. Demianovich, D.B. Sanin, S.V. Gamayunov, V.V. Martynova, N.B. Borysheva,
L.N. Titova, I.N. Ivanova, Magomedova A.N.*

A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research
Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia,
alyonadem1993@yandex.ru

Summary. Within the development of the treatment of esophageal cancer recurrence, it was necessary to assess the acceptable depth of tumor invasion. To solve this problem, a phantom simulated esophageal tissue was developed. Based on this phantom, various tumor sizes were simulated and radiation exposure to the organs-at-risk was assessed. The results formed the basis of new protocol for the treatment of esophageal cancer recurrence.

Key words: esophageal cancer, recurrence, HDR brachytherapy, dosimetric planning, organs-at-risk.

Актуальность. Рак пищевода является агрессивным заболеванием с низкими показателями выживаемости и ограниченными возможностями лечения на поздних стадиях. В России в 2015 году первичный рак пищевода на III–IV стадии выявлен в 66,5% случаев, заболеваемость среди мужчин и женщин составила 7.6 и 2.4 случая на 100 тыс. населения, а летальность на первом году составила 58,8% [1,2]. Общая 5-летняя относительная выживаемость составляет 17% [3;4]. Причина неудовлетворительных отдаленных результатов заключается в том, что рак пищевода диагностируется на достаточно поздней стадии. На момент первичного обращения более 50% больных имеют отдаленные метастазы, около 30% имеют местно-распространенные стадии и менее 20% - локализованные опухоли, которые можно вылечить [5].

Лучевая терапия играет важную роль в лечении рака пищевода: при неоперабельном раке пищевода и в качестве неоадьювантной терапии основным является химиолучевой метод лечения [6].

Оптимальной является 3D конформная дистанционная лучевая терапия (СОД порядка 50-55Гр) в стандартном режиме фракционирования для самостоятельной ХЛТ (ежедневно от 1,8 до 2 Гр за фракцию) [7]. Частота локорегионарных рецидивов после окончания химиолучевой терапии для рака пищевода достигает 40-60% [8]. Часть таких пациентов направляются на «спасительную» терапию.

Важной задачей является разработка новых методик, направленных на изучение и внедрение методов локального воздействия на рецидивную опухоль с минимальным воздействием на окружающие ткани. Одним из таких методов может быть «спасительная» брахитерапия.

Таким образом, актуальна разработка методики локального воздействия на рецидивную опухоль пищевода после проведенной ранее ХЛТ с использованием внутрисветной брахитерапии источником высокой мощности дозы.

Материалы и методы. В рамках создания нового протокола была поставлена задача оценить допустимую для лечения методом высокоэнергетической брахитерапии, глубину прорастания опухоли. Для определения этого параметра был разработан тканезквивалентный фантом, моделирующий пищевод. Внутри фантома был помещён буж диаметром 10 мм, внутри бужа проходил универсальный катетер для подведения источника ^{192}Ir . Внутри катетера помещался рентгенконтрастный маркер, для визуализации катетера. Контроль положения эндостата осуществлялся по данным компьютерной томографии. Полученные изображения были перенесены в систему дозиметрического планирования BrachyVision (Varian, USA). В данной программе были смоделированы различные дозиметрические планы с глубиной прорастания РТВ (планируемый объем мишени) 0,5 – 2 см (с шагом 0,5 см). В зависимости от расположения опухоли нужно учитывать лучевую нагрузку на такие критические органы, как спинной мозг, аорта, трахея, легкие, сердце, кости, слизистая оболочка.

Условия оценки: $V100 = 90 \%$, контрольная точка ставится на уровне середины РТВ, на расстоянии 1 см от центра источника, слизистая – 1 мм от внешней стенки бужа, на 2 см длиннее с каждой стороны от РТВ, диаметр бужа – 10 мм. Основным критическим органом выступает слизистая пищевода.

По полученным данным были рассчитаны дозы $\text{EQD}_2 (\alpha/\beta = 5)$ и ВДФ.

Результаты. Поле детального анализа данных было выявлено, что при распространении опухоли на 5 - 7 см вдоль стенки пищевода и прорастании её на глубину 0,5 см, средняя разовая доза на слизистую будет равна 8,5 Гр. С увеличением глубины прорастания растёт нагрузка на слизистую (при адекватном оконтуривании мишени): так при глубине распространения 1 см, средняя доза на слизистую будет уже 13,3 Гр. При глубине поражения 1,5 см и протяжённости 5 см – 19,3 Гр на слизистую, а если протяжённость опухоли 7 см при таком глубоком прорастании – уже на слизистую придётся 20,1 Гр. Следовательно, глубина прорастания и протяжённость поражения - важный критерий отбора пациентов для безопасного планирования лечения.

Таким образом, исходя из полученных результатов, при всех параметрах фракционирования разовое значение дозы в контрольной точке не превышает 14,8 Гр., что не превышает допустимой критической РОД по данным ESTRO и ABS [11]. В связи с этим, ключевым ограничивающим фактором будет являться СОД на слизистую.

Режим облучения: 5*5 Гр (пн-ср-пт-пн-ср). Для опухолей толщиной до 0,5 см СОД на слизистую составит 42,5 Гр. При толщине опухоли 1,0 см СОД на слизистую составит 66,5 Гр. При этом Доза по ВДФ составит 37,7 Гр (фактор ВДФ = 63), а $\text{EQD}_2 (\alpha/\beta) = 35,7$ Гр

При опухолях толщиной 1,5 см брахитерапия будет проводится с паллиативной целью для предотвращения дисфагии и расчеты будут выполняться на толщину 1,0 см.

Литература

1. Состояние онкологической помощи населению в России в 2015 году/ под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. 236 с.
2. Wu P.C., Posner, M.C. The role of surgery in the management of oesophageal cancer // *Lancet Oncol.* 2003. Vol. 4, № 8. P. 481–8.
3. Stahl M., Budach W., Meyer H.J., Cervantes A. and ESMO Guidelines Working Group. Esophageal cancer: Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Ann. Oncol.* 2010. Vol. 21. P. 46–49.
4. Zhang Y. Review Epidemiology of esophageal cancer // *World J. Gastroenterol.* 2013. Vol. 19, № 34. P. 5598–606.
5. Hayeck T.J., Kong C.Y., Spechler S.J., et al. The prevalence of Barrett's esophagus in the US: estimates from a simulation model confirmed by SEER data // *Dis. Esophagus.* 2010. Vol. 23, № 6. P. 451–7.
6. Smith G.L., Smith B.D., Buchholz T.A., et al. Patterns of care and locoregional treatment outcomes in older esophageal cancer patients: the SEER-Medicare Cohort // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2009. Vol.74. P. 482–9.
7. Kleinberg L.R., Catalano P.J., Forastiere A.A. Eastern Cooperative Oncology Group and American College of Radiology Imaging Network Randomized Phase 2 Trial of Neoadjuvant Preoperative Paclitaxel/Cisplatin/Radiation Therapy (RT) or Irinotecan/Cisplatin/RT in Esophageal Adenocarcinoma: Long-Term Outcome and Implications for Trial Design // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2016. Vol. 94, № 4. P. 738–46.
8. Folkert M., Cohen G., Wu A., et al. Endoluminal High-Dose-Rate Brachytherapy for Early Stage and Recurrent Esophageal Cancer in Medically Inoperable Patients // *Brachytherapy.* 2013. Vol. 12. P. 463–70/

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОК ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО И НЕИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЙ

Е.С. Евстратова¹, В.Г. Петин²

¹ ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия,

² МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия, e-mail: ekeys7240@mail.ru

Резюме. В работе показаны результаты фенотипического проявления генетической нестабильности дрожжевых клеток дикого типа и их радиочувствительных мутантов, выживших после облучения γ -квантами, α -частицами и УФ излучением. Было обнаружено, что эффект задержанного появления колонии облученными клетками более выражен для диплоидных клеток дикого типа в отличие от изогенного гаплоидного штамма. Аналогичные эксперименты были проведены для гаплоидных и гомозиготных диплоидных радио- и УФ-чувствительных мутантов.

Ключевые слова: УФ свет, гамма-кванты, альфа-частицы, фенотипическое проявление генетической нестабильности, ОБЭ, дрожжевые клетки

PHENOTYPIC MANIFESTATION OF GENETIC INSTABILITY OF YEAST AFTER ACTION OF IONIZING AND NONIONIZING RADIATIONS

E.S. Evstratova¹, V.G. Petin²

¹ National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia,

² A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, e-mail: ekeys7240@mail.ru

Summary. The results of the phenotypic manifestation of genetic instability of wild-type yeast cells and radiosensitive mutants that survived after γ -ray irradiation, α -particles and UV radiation are presented in this work. It was found that the effect of delayed colony appearance by irradiated cells is more pronounced for wild-type diploid cells, in contrast to the isogenic haploid strain. Similar experiments were carried out for haploid and homozygous diploid radio- and UV-sensitive mutants.

Key words: UV light, gamma rays, alpha particles, phenotypic manifestation of genetic instability, RBE, yeast cells

Актуальность. Генетическая нестабильность касается таких важных явлений, как радиационный мутагенез, канцерогенез, старение, отдаленные эффекты ионизирующей радиации и ультрафиолетового излучения [1]. К генетической нестабильности относятся хромосомные aberrации, репродуктивная клеточная гибель, перегруппировка генома, злокачественная трансформация, снижение эффективности клонирования и гетерогенность среди потомства облученных клеток. Общим свойством различных задержанных эффектов излучения является передача субповреждений отдаленным потомкам выживших после облучения клеток. Состояние нестабильности генома часто предшествует формированию опухоли [1] и сохраняется долгое время после облучения во многих клеточных поколениях [2, 3]. В работе [4] были рассмотрены различные факторы, такие как плоидность клеток, фаза клеточного цикла, транскрипционная активность конкретной области ДНК, метаболическая стадия клетки, ее дыхательная способность и, наконец, потенциальное воздействие эндогенного или экзогенного стресса, которые могут влиять на стабильность генома. Отсроченное формирование колоний клетками, выживающими после воздействия ионизирующего излучения, можно также рассматривать как пример фенотипического

проявления генетической нестабильности облученной клетки [2, 4]. Общим свойством различных задержанных эффектов излучения является передача субповреждений отдаленным потомкам выживших после облучения клеток. Недостаточно изученным аспектом этой проблемы является количественное сравнение выживаемости и генетической нестабильности для гаплоидных и диплоидных клеток, выживших после воздействия канцерогенных факторов – γ -квантов, α -частиц и УФ света.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были выбраны дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, различного генотипа: дикие штаммы S288C (RAD) и XS800 (RAD/RAD), XS2316 (RAD/RAD), T1 (RAD/RAD); радиочувствительные мутантные штаммы XS1806 (*rad50/rad50*), XS774-4d (*rad51*) и XS806 (*rad51/rad51*); g160/2d (*rad52*) и XS1898 (*rad52/rad52*); XS1889 (*rad53/rad53*), g218/7c (*rad54*) и XS1879 (*rad54/rad54*), XS1935 (*rad55/rad55*), XS1943 (*rad56/rad56*); УФ-чувствительные мутантные штаммы T2 (*rad2/rad2*), XS1956 (*rad6/rad6*), XS1924 (*rad18/rad18*), а также гаплоидные варианты с мутациями в локусах *rad2*, *rad6*, *rad9*, *rad18*. В качестве редкоизирующего излучения использовали γ -кванты ^{60}Co (0,2 кэВ/мкм, 20 Гр/мин), в качестве плотноизирующего – α -частицы ^{239}Pu (120 кэВ/мкм, 23 Гр/мин). УФ облучение проводили с помощью трансиллюминатора (254 нм). Выживаемость определяли способностью клеток формировать макроколонии на твердой питательной среде. Фенотипическое проявление генетической нестабильности оценивали по степени задержки формирования колоний клетками, выжившими после облучения. Каждый опыт повторяли не менее 5 раз.

Результаты. Тест выживаемости показал, что облучение УФ светом гаплоидных и диплоидных дрожжевых клеток приводит к сигмовидной форме кривых выживаемости независимо от пloidности клеток. Гаплоидные дрожжевые клетки более чувствительны к УФ излучению, чем диплоидные (в 1,6 раза для выживаемости 10%). После облучения редкоизирующим излучением кривая выживаемости гаплоидных клеток экспоненциальна, тогда как диплоидных – сигмоидная. И они были более устойчивыми по сравнению с гаплоидными клетками (в 6,2 раза для выживаемости 10%). После облучения α -частицами форма кривых выживаемости гаплоидных и диплоидных клеток оставалась без изменений по сравнению с γ -облучением. Различие в их радиорезистентности также снизилось (в 2,1 раза для выживаемости 10%). Мы сравнили фенотипическое проявление генетической нестабильности, вызванную УФ светом, альфа- и гамма-излучениями в гаплоидных и диплоидных клетках различного генотипа. По мере увеличения дозы используемого фактора доля выживших диплоидных клеток, образующих колонии позже, чем в контроле, увеличивается и достигает почти 100% только для диплоидных клеток, тогда как этот эффект составляет около 20–30% для гаплоидных клеток независимо от вида излучения. Из этих данных можно сделать вывод, что с увеличением дозы воздействующего агента увеличивается доля клеток, содержащих неэффективные наследуемые субповреждения, ответственные за задержанное появление колоний. Фенотипическое проявление генетической нестабильности гаплоидных дрожжевых клеток, также характеризующихся сигмоидной формой кривой выживаемости после УФ облучения, гораздо менее выражено, чем в диплоидных клетках, и составляет около 30%. Это подтверждает наш вывод о том, что генетическая нестабильность в основном определяется пloidностью клеток, а не формой кривых выживаемости и способностью клеток восстанавливаться от повреждений. Чтобы сравнить эффективность действия ионизирующих излучений с влиянием УФ света для генетической нестабильности, мы представили зависимость задержки формирования колоний не от дозы, а от выживаемости клеток. Полученные результаты показывают, что задержка формирования колоний выжившими после облучения диплоидных дрожжевых клеток в

зависимости от их выживаемости была практически одинаковой после облучения УФ светом, редко- и плотноионизирующим излучениями. Эти данные свидетельствуют о том, что изоэффективное облучение излучениями разного качества индуцирует одинаковое число эффективных (летальных) повреждений и равное число сопровождающих их субповреждений, ответственных за генетическую нестабильность, проявляющуюся поздним формированием колоний облученными клетками. Эти субповреждения сохраняются в отдаленных потомках выживших после облучения клеток и тем самым вызывают дестабилизацию генома, что проявляется в задержке формирования колоний и появлению фенотипически различающихся клонов.

Обсуждение. Отсроченное появление колоний клетками, выжившими после воздействия ионизирующих и УФ излучений, подобно другим эффектам, таким как хромосомные aberrации, репродуктивная клеточная гибель, перегруппировка генома и гетерогенность среди потомков облученных клеток, представляют примеры генетической нестабильности облученной клетки [4]. Результаты, полученные для выживаемости и замедленного появления колоний изогенными гаплоидными и диплоидными дрожжевыми клетками дикого типа, выживающими после воздействия различных излучений, иллюстрирующих генетическую нестабильность, частично подтверждены ранее опубликованными данными [2, 3]. Мы предположили, что генетическая нестабильность может существенно определяться ploидностью дрожжевых клеток и не связана с формой кривой зависимости выживаемости от дозы и способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений. Для проверки этого предположения мы сравнили задержанное образование колоний гаплоидными и гомозиготными диплоидными штаммами дикого типа и радиочувствительными мутантами, выживающими при воздействии излучений с различными ЛПЭ. Было показано, что как резистентные, так и радиочувствительные диплоидные штаммы, в отличие от гаплоидных, демонстрируют большую степень фенотипического проявления генетической нестабильности (100% против 20–30%) независимо от качества излучения.

Выводы. Совокупность представленных в работе данных позволяет сделать вывод, что для изученных воздействующих факторов генетическая нестабильность в большей степени детерминируется ploидностью клеток, а не формой кривых выживаемости и способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений, как неоднократно предполагалось в более ранних работах [2]. Если такая же закономерность будет проявляться и для клеток млекопитающих, можно допустить, что гаплоидные половые клетки в меньшей степени подвержены генетической нестабильности, чем диплоидные соматические клетки животных и человека.

Список литературы

1. Shen Z. Genomic instability and cancer: an introduction // *J. Mol. Cell Biol.* 2011. Vol. 3, № 1. P. 1–3.
2. Korogodin V.I., Bliznik K.M., Kapultcevich Yu.G. et al. Cascade mutagenesis: regularities and mechanisms // *Proc. 2-nd Int. N.W. Timofeef-Ressovsky Conference.* Dubna. 2007. V. 1. P. 419-447.
3. Petin V.G., Pereklad O.V., Nili M. et al. Yeast cells retain a memory of their original radiation-induced insult // *J. Radiat. Industry* 2008. V. 2, № 2. P. 59-64.
4. Skoneczna A., Kaniak A., Skoneczny M. Genetic instability in budding and fission yeast – sources and mechanisms // *FEMS Microbiol. Rev.* 2015. Vol. 39. P. 917-67.

НАРУШЕНИЕ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ МЫШЕЙ В ОТДАЛЁННЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ОДНОКРАТНОГО ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

А.С. Журник, О.Д. Смирнова, Е.Ю. Москалева

ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия, e-mail: Zhirnik_AS@nrcki.ru

Резюме. С помощью тестов «открытое поле», «условно-рефлекторное замирание» и «водный лабиринт Морриса» были изучены двигательная активность и когнитивные функции мышей через 1 и 2 месяца после локального однократного γ -облучения головного мозга в дозах 2 и 8 Гр. Выявлено повышение двигательной активности и нарушение пространственного обучения и памяти у мышей, облучённых в дозе 8 Гр, но не 2 Гр. Облучение в обеих дозах не приводило к нарушениям обстановочной памяти в выбранные сроки после облучения.

Ключевые слова: гамма-излучение, облучение головного мозга, когнитивные нарушения, отдалённые последствия, водный лабиринт Морриса

LATE COGNITIVE IMPAIRMENT IN MICE AFTER SINGLE WHOLE BRAIN GAMMA-IRRADIATION

A.S. Zhirnik, O.D. Smirnova, E.Y. Moskaleva

National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russia,
e-mail: Zhirnik_AS@nrcki.ru

Summary. Open field, contextual fear conditioning and the Morris water maze were used to study the locomotion and cognitive functions in mice 1 and 2 months after whole brain γ -irradiation at single doses of 2 Gy and 8 Gy. Mice irradiated at a dose of 8 Gy, but not 2 Gy, had increased motor activity and impaired spatial learning and memory 1 and 2 months after irradiation. Exposure of mice to γ -radiation at both doses did not impair the contextual fear conditioning memory at each time interval studied.

Key words: gamma radiation, whole brain irradiation, cognitive impairment, late effects, Morris water maze

Современное лечение пациентов с первичными опухолями и метастатическими поражениями головного мозга предполагает проведение локального облучения органа в режиме радиохирургии или в режиме гипофракционирования. Серьёзными постлучевыми осложнениями являются нейрокогнитивные расстройства - снижение способности к обучению и снижению памяти, возникающие в отдалённый период после облучения [1]. Для разработки средств профилактики и лечения таких осложнений необходимо изучить характер когнитивных нарушений, вызываемых действием ионизирующего излучения на головной мозг, и лежащие в их основе молекулярные и клеточные механизмы. Эти данные могут быть получены в модельных экспериментах с использованием лабораторных животных.

Целью работы было исследование влияния локального однократного γ -облучения головного мозга в умеренных дозах на когнитивные функции мышей в отдалённый период.

В экспериментах использовали самцов мышей инбредной линии C57BL/6 (возраст 7-8 недель) массой 18-21 г, полученных из питомника «Столбовая» и содержащихся в стандартных условиях вивария, со свободным доступом к воде и пище. Проводили сеансы локального γ -облучения головного мозга мышей в дозах 2 и 8 Гр (^{60}Co ; 2,35 Гр/мин; $t^\circ_{\text{комн}}$; установка «ГУТ-200М», НИЦ «Курчатовский институт»).

На время облучения животных помещали в специальные прозрачные пластмассовые фиксаторы. Для предотвращения воздействия γ -излучения на другие ткани использовали свинцовую защиту. Через 1 и 2 месяца после облучения оценивали общую двигательную активность, обстановочную ассоциативную память и пространственные обучение и память с помощью тестов «открытое поле», «условно-рефлекторное замирание» и «водный лабиринт Морриса». Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. В каждой экспериментальной группе было по 12 животных.

Выбранные условия облучения позволили обеспечить локальное действие γ -излучения на головной мозг животных без существенного воздействия на другие ткани. Так, количество лейкоцитов в периферической крови контрольных мышей и мышей, подвергнутых действию γ -излучения в дозах 2 и 8 Гр, через 3 суток после облучения составило $13,3 \pm 0,8 \times 10^9/\text{л}$, $11,5 \pm 0,7 \times 10^9/\text{л}$ и $12,6 \pm 1,5 \times 10^9/\text{л}$ соответственно ($p > 0,05$). При изучении двигательной активности и ориентировочно-исследовательского поведения животных с помощью теста «открытое поле» через 1 месяц после облучения различий в вертикальной и горизонтальной двигательной активности контрольных и облучённых мышей не было обнаружено. Через 2 месяца после облучения количество стоек с опорой и без опоры, а также время, проведённое в пристеночной, промежуточной и центральной зонах, не отличалось между группами, однако были отмечены большие в сравнении с контролем общий пройденный путь и общая средняя скорость мышей, облучённых в дозах 2 и 8 Гр. Результаты исследования обстановочной ассоциативной памяти мышей с использованием теста «условно-рефлекторное замирание» через 1 и 2 месяца после облучения показывают, что однократное локальное γ -облучение головного мозга в дозах 2 и 8 Гр не влияет на уровень спонтанных замираний (группы активного контроля), способность к обучению и длительность эпизодов замирания животных при повторном попадании в известную обстановку. При использовании теста «водный лабиринт Морриса» через 1 и 2 месяца после облучения не было выявлено различий в скорости обучения и воспроизведения пространственной памяти у контрольных мышей и мышей, облучённых в дозе 2 Гр. В то же время, мыши, облучённые в дозе 8 Гр, демонстрировали в сравнении с контрольными мышами большее время достижения платформы и меньшее количество пересечений зоны платформы при тестировании через 1 месяц после облучения, а также меньшую обучаемость, большее время достижения платформы, меньшее количество пересечений зоны платформы и меньший процент времени, проведённого в «целевом» квадранте, при тестировании через 2 месяца после облучения.

Полученные нами данные свидетельствуют о развитии нарушений пространственного обучения и памяти у мышей в отдалённый период после локального однократного γ -облучения головного мозга в дозе 8 Гр и их отсутствие при облучении в меньшей дозе равной 2 Гр. При этом нарушений обстановочной ассоциативной памяти мышей в исследованные сроки после облучения в обеих дозах не было обнаружено. Это согласуется с результатами других исследований [2, 3]. Наблюдаемые нарушения могут быть обусловлены развитием нейровоспаления, угнетением нейрогенеза в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа и субвентрикулярной зоне боковой стенки желудочков мозга, а также изменением проницаемости гемато-энцефалического барьера [4].

Список литературы

1. Béhin A., Delattre J.Y. Complications of radiation therapy on the brain and spinal cord // *Seminars in Neurology*. – 2004. – Vol. 24, No. 4. – P. 405-417.

2. Stessin A.M., Banu M.A., Clausi M.G., Berry N., Boockvar J.A., Ryu S. FTY720/fingolimod, an oral S1PR modulator, mitigates radiation induced cognitive deficits // *Neuroscience Letters*. – 2017. – Vol. 658. – P. 1-5.
3. Zhang J., Tong F., Cai Q., Chen L.J., Dong J.H., Wu G., Dong X.R. Shenqi fuzheng injection attenuates irradiation-induced brain injury in mice via inhibition of the NF- κ B signaling pathway and microglial activation // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2015. – Vol. 36, No. 11. – P. 1288-1299.
4. Yang L., Yang J., Li G., Li Y., Wu R., Cheng J., Tang Y. Pathophysiological Responses in Rat and Mouse Models of Radiation-Induced Brain Injury // *Molecular Neurobiology*. – 2017. – Vol. 54, No. 2. – P. 1022-1032.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОТВЕТА ПОПУЛЯЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ОДНОКРАТНОЕ И ФРАКЦИОНИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ РЕДКОИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

И.А. Замулаева, О.Н. Матчук, Е.И. Селиванова

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба –
филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, г. Обнинск
e-mail: zamulaeva@mail.ru

Резюме. Выявлены закономерности ответа опухолевых стволовых клеток (ОСК) на фракционированное воздействие редкоионизирующего излучения в экспериментальных и клинических условиях. Результаты работы свидетельствуют о радиорезистентности ОСК не только к однократному, но и фракционированному облучению, а также указывают на необходимость учета радиобиологических свойств ОСК при разработке новых противоопухолевых средств и развитии методов персонализированной медицины.

Ключевые слова: опухолевые стволовые клетки, ионизирующее излучение, радиорезистентность

REGULARITIES OF CANCER STEM CELL RESPONSE TO SINGLE AND FRACTIONATED EXPOSURE TO LOW-LET IONIZING RADIATION

I.A. Zamulaeva, O.N Matchuk, E.I. Selivanova

A. Tsyb Medical Radiological Research Centre - branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia
e-mail: zamulaeva@mail.ru

Summary. Regularities of cancer stem cell (CSC) response to fractionated exposure to low-LET ionizing radiation have been clarified in experimental and clinical conditions. The results of the work testify to the radioresistance of CSCs not only to single, but also fractionated irradiation, and also indicate the need to take into account the radiobiological properties of CSCs when searching new antitumor agents and developing personalized medicine methods.

Key words: cancer stem cells, ionizing radiation, radioresistance

В последние годы происходило интенсивное исследование радиобиологических свойств ОСК, составляющих небольшую фракцию клеток в злокачественных новообразованиях почти всех локализаций и стабильных линиях опухолевых клеток человека и животных. Было доказано, что ОСК обладают более высокой резистентностью к редкоионизирующему излучению и многим противоопухолевым препаратам по сравнению с остальной массой клеток. Выявлены различные молекулярные механизмы радиорезистентности ОСК, которые в настоящее время являются основой для разработки средств и способов повышения чувствительности этих клеток к противоопухолевым воздействиям. При этом подавляющая часть исследований проводилась в условиях *in vitro* и касалась эффектов однократного радиационного воздействия, хотя для оценки клинического значения радиорезистентности ОСК необходимо понимание закономерностей влияния фракционированного облучения на эту популяцию клеток. Кроме того, радиационный ответ ОСК *in vivo* – значительно более сложный процесс, чем в клеточных культурах *in vitro*, поскольку включает влияние множества сигнальных молекул (например, TGF- β 1, FGF, IL-6, HIF, Wnt лиганды и т.д.), секретируемых не только опухолевыми, но и различными стромальными клетками, в том числе эндотелиальными, иммунными клетками,

опухоль-ассоциированные макрофаги, фибробласты, нормальные стволовые клетки и др. Кроме клеточных и гуморальных факторов, в формировании пула и биологических свойств ОСК участвуют такие физические факторы как концентрация кислорода и pH внеклеточной среды, влияющие на радиочувствительность. Поэтому выяснение закономерностей радиационного ответа ОСК в злокачественных новообразованиях *in vivo* представляет отдельный интерес.

Целью исследований, выполняемых в МРНЦ им. А.Ф. Цыба в течение ряда последних лет, было выяснение закономерностей и механизмов радиационного воздействия на ОСК в модельных системах *in vitro*, *in vivo* и в ходе лечения онкологических больных.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили стабильные культуры опухолевых клеток различных линий, опухоли экспериментальных животных и биологический материал злокачественных новообразований человека. Использовались известные методы идентификации ОСК с помощью проточной цитометрии, в том числе иммунофенотипирование по поверхностным маркерам CD24, CD44, CD133 и др., оценка эффективности исключения из клеток флуоресцентного красителя Хёхст 33342 (метод выявления так называемой боковой популяции – *side population* – SP) и определение активности фермента альдегиддегидрогеназа (ALDH тест). Изучалось изменение относительного и абсолютного размера популяции ОСК после однократного и фракционированного γ -облучения в разных дозах. В последнем случае экспериментальные условия моделировали лучевую терапию в режиме стандартного фракционирования дозы (по 2 Гр ежедневно) до достижения суммарной дозы 10 Гр. Объектами исследования являлись клеточные культуры рака молочной железы (РМЖ) человека линии MCF-7, а также рака шейки матки (РШМ) линий HeLa и SiHa. В части экспериментов выполняли сортировку ОСК (SP) на приборе FACS Vantage (Becton Dickinson, США) и определяли репродуктивную выживаемость (клоногенную активность) ОСК после радиационного воздействия по сравнению с таковой остальных клеток.

Результаты. Во всех исследованных культурах доля ОСК (SP) после фракционированного облучения в суммарных дозах 6-10 Гр была выше, чем в необлученном контроле ($p < 0.01$). Максимальная величина этого показателя через 24 ч после облучения составила 14% для линии HeLa, 7% для линии SiHa и 12% для линии MCF-7, что соответствует увеличению в 2.6, 28.0 и 6.7 раз по сравнению с соответствующим контролем. Важно, что радиационный ответ популяции ОСК, выявленный методом SP и заключающийся в повышении доли этих клеток, в целом подтверждается и другими методами. С помощью метода иммунофенотипирования по поверхностным маркерам ОСК показано повышение доли CD133⁺ клеток в культуре РШМ линии SiHa и доли CD44⁺CD24^{-/low} клеток в культуре РМЖ линии MCF-7 после облучения. При этом статистически значимые различия зарегистрированы только при дозах 8 и 10 Гр, а максимальное увеличение доли ОСК линий SiHa и MCF-7 составило 2.2 и 3.2 раза по сравнению с контролем, соответственно. Таким образом, эффекты, обнаруженные с помощью метода иммунофенотипирования, выражены слабее по сравнению описанными выше эффектами действия фракционированного облучения на SP.

Доля ОСК изучалась также в биологическом материале злокачественных опухолей различных локализаций, включая РШМ и РМЖ, до лечения больных и после облучения в суммарной очаговой дозе 10Гр. Обнаружена высокая индивидуальная вариабельность доли ОСК до лечения и после радиационного воздействия, при этом у части больных выявлено радиационно-индуцированное повышение этого показателя. Полученные результаты свидетельствуют о наличии существенных индивидуальных

различий в ответе ОСК на радиационное воздействие, что обосновывает необходимость дальнейшего исследования прогностической значимости количественных изменений ОСК после первых сеансов лучевой терапии в отношении ближайших и отдаленных результатов лечения.

Обсуждение. Резистентность ОСК к однократному острому воздействию редкоизионизирующего излучения является широко известным фактом, который был обнаружен нами и другими авторами в культурах опухолевых клеток различного происхождения *in vitro*, опухолях экспериментальных животных и ксенографтах опухолевой ткани человека в организме иммунодефицитных мышей. Интересно, что в ряде исследований проводилось сопоставление эффектов однократного и фракционированного облучения *in vitro* по критерию изменения доли ОСК, выявляемых по иммунофенотипу в клеточных культурах глиомы [1] и РШМ [2], или по критерию количества маммосфер, образующихся после облучения стабильных культур рака молочной железы [3]. В этих исследованиях показаны более выраженные эффекты фракционированного облучения по сравнению с однократным.

Наблюдаемое нами и другими авторами повышение количества ОСК после острого однократного и фракционированного облучения может объясняться целым рядом причин, в том числе: 1) более высокая радиорезистентность ОСК по сравнению с остальной массой опухолевых клеток; 2) выход ОСК из состояния пролиферативного покоя в процессе пострадиационной репопуляции опухолевых клеток, которая, вероятно, начинается с пула ОСК; 3) дедифференцировка сохранившихся после облучения не стволовых клеток и их переход в пул ОСК. В последнее время появляется всё больше данных о пластичности ОСК и возможности дедифференцировки не стволовых опухолевых клеток с их переходом в пул ОСК. Такой переход является, по-видимому, редким событием в интактных клеточных культурах/опухолях, но может происходить чаще под влиянием различных факторов, включая ионизирующее излучение [4].

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о радиорезистентности ОСК не только к однократному облучению (как было показано ранее), но и фракционированному воздействию редкоизионизирующего излучения в экспериментальных условиях, а также проясняют индивидуальную вариабельность изменений пула ОСК в ходе радиотерапии онкологических больных. В целом результаты работы указывают на необходимость учета радиобиологических свойств ОСК при разработке новых противоопухолевых средств и развитии методов персонализированной медицины.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №18-75-10025).

Список литературы

1. Gao X., McDonald J.T., Hlatky L., Enderling H. Acute and fractionated irradiation differentially modulate glioma stem cell division kinetics//Cancer Res. 2013. V.73, N5. P. 1481-1490.
2. Матчук О.Н. , Замулаева И.А. Количественные изменения популяции стволовых клеток рака шейки матки линии HeLa под влиянием фракционированного гамма-облучения *in vitro*//Радиация и риск. 2019. Т.28, №2. С. 112-123.
3. Phillips T.M., McBride W.H., Pajonk F. The response of CD24^{low}/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation// J Natl Cancer Inst. 2006. V.98. P. 1777-1785.
4. Lee S.Y., Jeong E.K., Ju M.K. et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation// Mol Cancer. 2017. V.16, N1. Article 10.

**РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВТОРИЧНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И
НАВЕДЕННОЙ РАДИОАКТИВНОСТИ В МЕДИЦИНСКОЙ КАБИНЕ
ФАЗОТРОНА ОИЯИ ПРИ ПРОТОННОМ ОБЛУЧЕНИИ**

А.А. Иванов^{1,2,3}, *Т.М. Блохина*³, *Т.М. Бычкова*^{1,3}, *Н.Ю. Воробьева*¹, *Г.В. Мицын*²,
*А.Г. Молоканов*², *О.В. Никитенко*^{1,3}, *Я.В. Сидакова*¹, *С.В. Швидкий*², *Е.И. Яшкина*³,
*В.А. Шуршаков*¹, *А.Н. Осипов*³

¹ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия;

² Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия;

³ ФГБУ «Государственный научный центр РФ - Федеральный медицинский
биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва, Россия.

E-mail: a1931192@mail.ru;

Резюме. Установлено, что экспозиция мышей на пути протонного пучка (энергия 170 МэВ, поглощенная доза облучения на входе 1 Гр), перекрытого конструкцией из пластика, металла и воды, с водным эквивалентом 268,6 мм вызвали статистически значимое снижение числа кариоцитов в костном мозге и лейкоцитов в крови по сравнению с показателями биоконтроля, а также увеличение γ H2AX и tunnel - позитивных клеток. Двухминутная экспозиция мышей в медицинской кабине фазотрона после окончания медицинских сеансов и экспериментах обусловила снижение числа кариоцитов в костном мозге и увеличение числа двунитевых разрывов ДНК в клетках селезенки.

Ключевые слова: протоны, вторичное излучение, наведенная радиоактивность, костный мозг, ДНК

**RADIOBIOLOGICAL EFFECTS OF SECONDARY RADIATION AND INDUCED
RADIOACTIVITY IN THE MEDICAL CABIN
OF THE JINR PHASOTRON WITH THE PROTON IRRADIATION**

A.A. Ivanov^{1,2,3}, *T.M. Blokhina*³, *T.M. Bychkova*^{1,3}, *N.Yu. Vorobyova*³, *G.V. Mytsin*²,
*A.G. Molokanov*², *O.V. Nikitenko*^{1,3}, *Ya.V. Sidakova*¹, *S.V. Shvidky*², *E.I. Yashkina*³,
*V.A. Shurshakov*¹, *A.N. Osipov*³

¹ Institute of Biomedical Problems of RAS, Moscow, Russia;

² Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia;

³ State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center
of FMBA, Moscow, Russia.

E-mail: a1931192@mail.ru;

Summary. It is established that exposure of mice in the path of the proton beam (energy of 170 MeV, the absorbed radiation dose to 1 Gy), blocked with a design from plastic, metal, and water, with a water equivalent 268,6 mm caused a statistically significant decrease in the number of karyocytes in the bone marrow and white blood cells in blood in comparison with indicators of control, and increase γ H2AX and tunnel - positive cells. A two-minute exposure of mice in the medical cabin of the Phasotron after graduating from medical sessions and experiments has led to a decline in the number of karyocytes in the bone marrow and increasing the number of double-strand breaks DNA breaks in the cells of the spleen.

Key words: protons, secondary radiation, induced radioactivity, bone marrow, DNA

Вопросы радиационной безопасности пациентов и персонала при работе на ускорителях заряженных частиц имеют важное значение. Известно, что пациенты после проведения протонной терапии становятся на некоторое время источниками излучения, за счет наведенной радиоактивности. Соответственно и в помещении медицинской

кабины ускорителя формируется наведенная радиоактивность. В этой связи, по нашему мнению, интегральную оценку радиационной опасности возможно провести, используя живые системы, в частности, помещая во внутрь кабины биологические объекты. Для этого нами была выбрана модель – мыши. Целью данного сообщения стало описание наблюдения о влиянии на иммуно-гематологический и цитогенетический статус мышей вторичного излучения, формирующегося при работе ускорителя, и кратковременной экспозиции в медицинской кабине фазотрона ОИЯИ после завершения сеансов лучевой терапии и экспериментов.

Материалы и методы

Облучение. Наши наблюдения проведены в медицинской кабине фазотрона ОИЯИ при использовании в медицинских и экспериментальных целях протонного пучка с энергией 170 МэВ. В течение рабочего дня для медицинских целей фазотрон включали несколько раз и суммарная доза излучения составила около 3 Гр.

Кроме того было проведено шесть радиобиологических экспериментов – доза облучения составила 6 Гр при средней мощности дозы 0,5 Гр/мин. В экспериментах использовался водный фантом размером 16×25 см, который трижды был облучен в суммарной дозе 3 Гр. Итого общая доза протонного излучения в кабине составила порядка 9 Гр. Следует также иметь ввиду, что медицинское облучение и эксперименты в этой кабине в рабочее время проводились в течение многих месяцев и лет.

Изучение радиобиологического эффекта вторичного излучения проведено по следующей схеме. Мыши были облучены тотально в дозе 1 Гр на плато пика Брэгга – 1 группа. Вторая группа была помещена на пути пучка протонов, перекрытого сложной защитой с водным эквивалентом 268,6 мм, состоящей из углепластика, алюминия – 4 мм и водного фантома 16×25 см, предварительно облученной в дозе 6 Гр (6 фракций по 1 Гр). При этом была отпущена доза 1 Гр. В соответствии с кривой Брэгга поток протонов был полностью перекрыт. Мыши были экспонированы в кабине по пути предполагаемого пучка в течение 2 мин.

Радиобиологическую оценку наведенной в кабине фазотрона радиоактивности провели сразу после окончания экспериментов – группа № 3. При выключенном фазотроне мышей поместили рядом с водным фантомом на 2 минуты при закрытой двери. Дополнительное время экспозиции на закрытые и открытые двери кабины составило около 1 минуты. Четвертую группу составили животные транспортного биологического контроля.

Эксперимент выполнен на аутбредных мышах ICR CD-1 самках, со средней массой тела 26 г. Облучение проводили в стандартных пластиковых контейнерах для мышей. Одновременно осуществляли облучение 4х животных.

Обследование животных проводили через 18-19 часов после экспозиции в кабине фазотрона. Эвтаназию осуществляли методом декапитации.

Массу тела животных, силу захвата передних лап, массу тимуса и селезенки, число кариоцитов в костном мозге, уровень лейкоцитов в периферической крови, число хромосомных aberrаций в костном мозге, уровень двунитевых разрывов ДНК в клетках селезенки оценивали ранее описанными методами [1, 2, 3].

Результаты

В ходе экспериментов установлено, что через 18 часов после облучения мышей в дозе 1 Гр на плато пика Брэгга отмечается статистически значимое снижение числа кариоцитов в костном мозге, числа лейкоцитов в периферической крови, массы тимуса и селезенки (группа № 1) по сравнению с показателями в группе мышей транспортного контроля (группа № 4) и в группе № 3 (экспозиция с выключенным фазотроном).

Кроме того в группах № 1-3 отмечено увеличение уровня силы захвата передних конечностей.

Цитогенетические эффекты являются наиболее чувствительными и достаточно специфичными при действии радиации. Через 18-19 часов после облучения протонами в дозе 1 Гр в клетках селезенки отмечается статистически значимое, более чем двукратное, увеличение уровня двунитевых разрывов ДНК: γ H2AX и tunnel позитивных клеток у облученных животных. Кроме того отмечено статистически значимое, десятикратное, увеличение числа хромосомных aberrаций в клетках костного мозга облученных животных.

Облучение мышей через слой воды толщиной 25 см также вызвало ряд радиобиологических эффектов (группа № 2). Так, зарегистрировано статистически значимое снижение по сравнению с группой транспортного контроля числа кариоцитов в костном мозге и лейкоцитов в периферической крови.

По молекулярно-генетическим показателям отмечено статистически значимое по сравнению с показателем транспортного контроля увеличение выхода двунитевых разрывов ДНК, до уровня у животных группы № 1.

Отмечено также статистически значимое трехкратное увеличение показателя хромосомных aberrаций.

После экспозиции мышей в медицинской кабине фазотрона ОИЯИ в течение двух минут также выявлены радиобиологические эффекты. Отмечено статистически значимое в сравнении с показателем в группе № 4 снижение на 20 % числа кариоцитов в костном мозге. По молекулярно-генетическим показателям отмечено небольшое, однако статистически значимое по отношению к группе № 4 ($p < 0,01$) повышение выхода γ H2AX фокусов и tunnel позитивных клеток.

Общее число хромосомных aberrаций увеличилось в два раза.

Таким образом, подводя итог результатам экспериментов, следует отметить, что при работе фазотрона в медицинской кабине регистрируются радиобиологические эффекты вне потока протонов. Наиболее вероятным объяснением которых является формирование вторичного излучения. В первые минуты после окончания сеансов лучевой терапии и экспериментов в кабине фазотрона формируется значительный уровень наведенной активности, способной вызвать радиобиологические эффекты у животных даже после кратковременной экспозиции. Изложенные факты должны привлечь внимание специалистов в области радиационной безопасности и гигиены.

Список литературы

1. Бушманов А.Ю., Воробьева Н.Ю., Блохина Т.М. и др. Влияние индралина на иммуно-гематологические показатели и поврежденность ДНК облученных аутбредных мышей ICR (CD-1) // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59, № 3. С. 279-285.
2. Natale F., Rapp A., Yu W. et al. Identification of the elementary structural units of the DNA damage response. Nat. Commun. 2017; 8: 15760. Published 2017 Jun 12. doi: 10.1038/ncomms15760.
3. Иванов А.А., Мицын Г.В., Абросимова А.Н. и др. Радиобиологические эффекты вторичного излучения фазотрона Объединенного института ядерных исследований // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017, Т. 51, № 2. С. 20-25.

АНАЛИЗ СПОНТАННЫХ И G2 ГАММА-ИНДУЦИРОВАННЫХ АБЕРРАЦИЙ ХРОМОСОМ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

Т.И. Иванова, В.А. Хорохорина, Н.И. Сыченкова, Л.И. Крикунова, И.А. Замулаева

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск,

Россия, e-mail: stasia14@yandex.ru.

Резюме. Изучено влияние стадий развития рака на частоту спонтанных и G2 гамма-индуцированных хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови пациенток с онкологическими заболеваниями женской репродуктивной сферы. Показано влияние стадии заболевания на индуцированный уровень aberrаций и отсутствие значимой связи с повышенной радиочувствительностью хромосом. Повышенный спонтанный мутагенез ассоциирован со стадией заболевания и не коррелировал с повышенной радиочувствительностью хромосом.

Ключевые слова: aberrации хромосом, гамма облучение, стадии развития рака, лимфоциты крови.

ANALYSIS OF SPONTANEOUS AND G2 GAMMA-INDUCED CHROMOSOMAL ABERRATIONS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN FEMALE WITH REPRODUCTIVE CANCER

T.I. Ivanova, V.A. Khorokhorina, N.I. Sychenkova, L.I. Krikunova, I.A. Zamulaeva

A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia,

e-mail: stasia14@yandex.ru

Summary. The effect of cancer development stages on the frequency of spontaneous and G2 gamma-induced chromosomal aberrations in the blood lymphocytes of female with reproductive cancer was studied. The effect of the stages of cancer on the induced level of aberration and the absence of a significant relationship with increased G2 chromosomal radiosensitivity are shown. Elevated spontaneous mutagenesis is associated with the stage of cancer and did not correlate with increased G2 chromosomal radiosensitivity.

Key words: chromosome aberrations, gamma irradiation, stages of cancer development, blood lymphocytes.

Введение. Актуальность проводимых исследований обусловлена ростом онкологических заболеваний и поиском новых высокоэффективных способов прогнозирования их лечения. Приблизительно 50% солидных злокачественных опухолей подвергаются радиотерапии [1]. Применяемые режимы облучения рассчитаны с учётом минимальных побочных эффектов, тем не менее около 5% пациентов будут иметь серьезные негативные последствия, т.к. обладают повышенной радиочувствительностью [2]. Лучевые поражения плохо поддаются лечению, поэтому изучение реакции нормальных тканей на лучевую терапию имеет большое значение.

Стандартным маркером радиочувствительности служат хромосомные aberrации (ХА), индуцированные на G2 стадии клеточного цикла гамма-излучением в лимфоцитах периферической крови [3]. Показано, что частота индуцированных ХА ассоциирована с различными генными полиморфизмами [4,5,6]. В ряде исследований сообщалось, что повышенная радиочувствительность, измеренная на хромосомном уровне (G2 анализ), присутствует у больных раком [7]. Нам не удалось найти работы, в которых изучалась связь спонтанных и индуцированных хромосомных aberrаций (G2 анализ) в лимфоцитах периферической крови больных онкологическими

заболеваниями женской репродуктивной системы со стадией развития опухоли.

Целью работы была оценка влияния стадий злокачественных образований на частоту спонтанных и G2 гамма-индуцированных хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови у пациенток с онкологическими заболеваниями женской репродуктивной сферы.

Материалы и методы исследования. Группу исследования составляли 23 женщины с онкологическими заболеваниями матки, яичников и молочной железы (средний возраст $53,5 \pm 14,5$; 6 человек с III и IV стадиями по TNM классификации; 13 – I+II; у 4-ёх – информация отсутствовала). Они находились на лечении в МРНЦ им. А.Ф.Цыба. Одновременно обследуемые подписывали форму информированного согласия на участие в данном проекте, а врачом заполнялась анкета, включающая данные о возрасте, росте, весе, этнической принадлежности, диагнозе заболевания обследованных женщин. Исследование одобрено Этической комиссией МРНЦ.

Для проведения цитогенетического анализа хромосомных aberrаций в лимфоцитах использовали образцы крови, взятые из локтевой вены. Каждый образец делили на два варианта для исследования спонтанного и гамма-индуцированного уровня aberrаций. Культивирование лимфоцитов проводили по стандартной методике. Культуру лимфоцитов инкубировали в течение 72 часов при 37°C . За два часа до окончания инкубации культуры облучали гамма-лучами в дозе 0.5 Гр (Co^{60} , мощность дозы 0,335 Гр/мин) на стадии G2 клеточного цикла. Для накопления метафазных пластинок в среду добавляли колхицин (0,2 мг/мл культуры). Через 2 часа клетки осаждали центрифугированием, гипотонизировали 0.075 М хлористым калием и фиксировали смесью ледяной уксусной кислоты и абсолютного спирта (соотношение 1:3). Препараты окрашивали красителем Гимза (Панэко). Цитогенетический анализ проводили с помощью светового микроскопа при увеличении $\times 1000$. Хромосомные aberrации учитывали в метафазах, содержащих 45-46 хромосом. Просчитывая от 80 до 200 метафазных пластинок на человека, анализировали все виды aberrаций хромосом, распознаваемые без кариотипирования. Средние величины показателей рассчитывали по числу выявленных хромосомных нарушений на 100 метафаз.

Статистический анализ проводили стандартными методами с помощью пакета программ GraphPad Prism. Так как выборка малочисленна, для проверки нормальности распределения цитогенетических показателей использовался критерий Шапиро-Уилка. Данные представлены средними значениями \pm стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение. В ходе работы показано, что распределение aberrаций хромосомного типа в облучённых и необлучённых культурах не описывается нормальным законом. Остальные цитогенетические показатели описываются нормальным распределением только после воздействия облучения. В отсутствие ионизирующего воздействия закон нормального распределения для них не соблюдается. В группах, ранжированных по стадиям (I+II и III+IV), спонтанные и индуцированные цитогенетические показатели распределены нормально, кроме aberrаций хромосомного типа. В результате облучения значительно повысились уровни aberrантных метафаз ($59,5 \pm 10,9$; $P < 0,0001$); суммарных aberrаций ($136 \pm 40,1$; $P < 0,0001$); aberrаций хроматидного ($134,0 \pm 40,0$; $P < 0,0001$) и хромосомного типа ($1,34 \pm 1,23$; $P = 0,003$) по сравнению с таковыми в необлучённых культурах ($3,24 \pm 1,96$; $3,48 \pm 2,44$; $3,08 \pm 2,26$ и $0,4 \pm 0,76$, соответственно). Обнаружена прямая корреляция частоты aberrантных метафаз и aberrаций со стадией злокачественного процесса. В случае G2-индуцированных aberrаций и aberrаций хроматидного типа различия между начальными и поздними стадиями заболевания значимы ($125 \pm 34,1$ и $169 \pm 41,9$; $P = 0,0244$; $123 \pm 33,9$ и $168 \pm 42,6$; $P = 0,0242$). Спонтанный уровень этих показателей тоже повышен, но различия незначимы ($3,05 \pm 1,44$ и $5,25 \pm 3,95$; $P = 0,087$; $2,68 \pm 1,02$ и

4,67±3,89; P=0,096 соответственно). Уровни aberrантных метафаз повышены незначимо у лиц с поздними стадиями заболевания как в условиях облучения, так и в его отсутствие (57,4±11,4 и 66,5±8,35; P=0,104; 2,89±1,38; P=0,085).

Обнаружены лица с повышенными (превышающими верхнюю границу 95% интервала среднего значения) показателями aberrаций и aberrантных метафаз. В результате облучения у восьми человек частота aberrаций составляла более 150 aberrаций на 100 клеток, и у шести пациенток спонтанный уровень aberrаций превышал более 4,09 %. При облучении повышенная хромосомная радиочувствительность значимо не коррелирует со стадией опухоли (P=0,217). Выявлены 3 пациентки с I стадией, у которых наблюдалась высокая радиочувствительность хромосом. В данном случае могут иметь место сбои репарации, в основе которой, в частности, лежат наследственные факторы. В группе со спонтанным повышенным уровнем хромосомных aberrаций обнаружена одна пациентка с I стадией. Индуцированные гамма-лучами цитогенетические показатели у неё оказались невысокими: 83% - суммарный уровень aberrаций и 43,5% - частота aberrантных метафаз. Три пациентки с поздними стадиями заболевания были в группах с повышенным спонтанным и индуцированным уровнем aberrаций. Однако, статус нахождения в группе со спонтанным повышенным уровнем цитогенетических показателей значимо не коррелировал с повышенной радиочувствительностью хромосом (P=0,3839), но значимо коррелировал со стадией заболевания (P=0,011). Можно предположить, что с увеличением степени прогрессии опухоли накапливаются повреждения хромосом, обусловленные многими факторами, в частности, оксидативным стрессом, эпигенетическими изменениями.

Выводы. 1. Стадия развития рака влияет на G2 гамма-индуцированный уровень aberrаций (хроматидный тип). 2. Повышенный спонтанный уровень цитогенетических показателей значимо не коррелировал с повышенной радиочувствительностью хромосом, но значимо ассоциирован со стадией заболевания. 3. Не обнаружена значимая связь между стадией опухоли и повышенным G2 гамма-индуцированным уровнем aberrаций (хроматидный тип) лимфоцитов крови пациенток с онкологическими заболеваниями женской репродуктивной системы.

Список литературы

1. Bentzen S.M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology // *Nat Rev Cancer* 2006. Vol. 6, № 9. P. 702-713.
2. Rosenshtein B.S. Radiogenomics: Identification of Genomic Predictors for Radiation Toxicity // *Semin Radiat Oncol.* 2017. Vol. 27, № 4. P. 300-309.
3. Pantelias G.E., Terzoudi G.I. A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity // *Radiother Oncol.* 2011. Vol.101, № 1. P. 28-34.
4. Alsbeih G, et al. Chromosomal fragility syndrome and family history of radiosensitivity as indicators for radiotherapy dose modification // *Radiother Oncol.* 2003. Vol. 66, № 3. P. 341-344.
5. Ivanova T. I., et al. Polymorphism of Genes for Catechol_O_methyltransferase (COMT) and hemochromatosis (HFE) in Residents of Radiocontaminated Regions Varying in Chromosome Aberration Frequency // *Biophysics*, 2010, Vol. 55, № 6. P. 1075–1083.
6. Сальникова Л.Е., и др. Генетические и цитогенетические предикторы радиочувствительности хромосом человека // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2013. Т. 53, № 3. С. 259-266.
7. Terzoudi G.I., et al. Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients: the role of cdk1/cyclin-B activity level in the mechanisms involved // *Int J Radiat Biol.* 2000 Vol. 76, № 5. P. 607-615.

**БАНК БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА
СЕВЕРСКОГО БИОФИЗИЧЕСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА**

*Д.С. Исубакова¹, Е.В. Брониковская¹, О.С. Цымбал¹, М.В. Халюзова¹,
Н.В. Литвяков^{1,2}, И.В. Мильто^{1,3}, Л.Р. Тахауова³, Р.М. Тахауов^{1,3}*

¹ФГУП «Северский биофизический научный центр» ФМБА России, Северск, Россия,
e-mail: sbnc@fmbamail.ru

²ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук», Томск, Россия

³ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Томск, Россия

Резюме. Банк биологического материала (ББМ) создан в Северском биофизическом научном центре (СБН Центр) в 2002 г. Основной целью создания ББМ является сбор и хранение уникального биологического материала (БМ) сотрудников Сибирского химического комбината (СХК) и жителей прилегающих территорий (г. Северск). В настоящее время ББМ содержит около 17 000 образцов БМ от более чем 5 000 доноров. ББМ представляет собой уникальный репозиторий образцов БМ для оценки эффектов хронического техногенного облучения низкой интенсивности.

Ключевые слова: банк биологического материала, техногенное ионизирующее излучение, «малые» дозы радиации, ДНК, цитогенетические препараты, биопсийный, операционный и аутопсийный материал

**THE BANK OF BIOLOGICAL MATERIAL
OF THE SEVERSK BIOPHYSICAL RESEARCH CENTER**

*D.S. Isubakova¹, E.V. Bronikovskaya¹, O.S. Tsymbal¹, M.V. Khalyuzova¹,
N.V. Litviakov^{1,2}, I.V. Milto^{1,3}, L.R. Takhauova³, R.M. Takhauov^{1,3}*

¹Seversk Biophysical Research Center, Seversk, Russia, e-mail: sbnc@fmbamail.ru

²Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia

³Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Summary. The Bank of biological materials (BBM) was established at the Seversk Biophysical Research Center in 2002. The main aim of creating of the BBM is collection and storage samples of unique biological material (BM) from employees of the Siberian Group of Chemical Enterprises and residents of the surrounding territories (Seversk city). The BBM contains about 17,000 samples of BM from more than 5,000 donors. The BBM is a unique repository of samples of BM for assessing the effects of chronic low-intensity radiation.

Keywords: biological material bank, technogenic ionizing radiation, small doses of radiation, DNA samples, cytogenetic preparations, biopsy, surgical and autopsy material

Завершение программы полного секвенирования генома человека сделало возможным изучение механизмов и эффектов воздействия на геном различных факторов. С целью изучения влияния на организм человека техногенных факторов возникла необходимость сбора и сохранения уникального БМ людей, которые подвергались воздействию этих факторов. Для достижения этой цели оптимальным был признан способ создания специальных «банков» [1-3]. Формирование ББМ в СБН Центре начато в 2002 г. с целью сохранения уникального генетического материала лиц, подвергшихся долговременному профессиональному техногенному радиационному воздействию (внешнему, внутреннему или сочетанному облучению), а также лиц, с социально значимыми неинфекционными заболеваниями (острый инфаркт миокарда (ОИМ), злокачественные новообразования (ЗНО)). Кроме того, в СБН Центре

создан региональный медико-дозиметрический регистр (РМДР) персонала СХК и населения г. Северска, содержащий информацию о возрасте, дозе облучения, данные о заболеваниях, причине смерти и пр.

Цель работы: формирование ББМ для проведения исследований по оценке генетических эффектов долговременного техногенного радиационного воздействия низкой интенсивности, изучение механизмов и маркеров индивидуальной радиочувствительности человека, а также патогенеза социально значимых неинфекционных заболеваний.

Материал и методы: донорами ББМ являются работники СХК и жители близлежащих территорий (г. Северск). Следуя разработанной методологии [4], ББМ содержит несколько единиц хранения для каждого человека: образцы ДНК и цельной крови. На каждого донора имеются цитогенетические препараты для оценки частоты и спектра хромосомных aberrаций. Для выделения ДНК используются метод фенол-хлороформной экстракции и колоночный метод, для приготовления цитогенетических суспензий – рутинный метод.

Результаты: в коллекции ББМ образцы БМ от условно здоровых работников СХК составляют 33,0 %, от жителей г. Северска – 40,8 %, от пациентов с ЗНО – 22,2 %, от пациентов с ОИМ – 4 %.

ББМ содержит образцы ДНК и венозной крови 1 912 человек (1 223 мужчины и 689 женщин) условно здоровых работников СХК (средний возраст мужчин – $54,95 \pm 0,39$ лет, женщин – $62,27 \pm 0,46$ лет). Из 1 912 условно здоровых работников СХК 788 человек (537 мужчин и 251 женщина) подвергались только внешнему облучению (γ -излучение), 92 человека (27 мужчин и 65 женщин) – только внутреннему облучению (инкорпорированный ^{239}Pu) и 797 человек (595 мужчин и 202 женщины) – сочетанному (внешнему и внутреннему) облучению. Из 1 912 условно здоровых работников СХК 235 человек (64 мужчины и 271 женщина) не подвергались облучению.

ББМ содержит образцы цельной венозной крови 753 работников СХК с ЗНО (485 мужчин и 268 женщин, средний возраст мужчин – $65,12 \pm 0,49$ лет, женщин – $65,60 \pm 0,52$ лет). Из 753 работников СХК с ЗНО 209 человек (163 мужчины и 46 женщин) подвергались только внешнему облучению, 50 человек (29 мужчин и 21 женщина) – только внутреннему облучению и 159 человек (119 мужчин и 40 женщин) подвергались сочетанному облучению. Из 753 работников СХК с ЗНО 335 человек (174 мужчины и 161 женщина) не подвергались облучению. ББМ содержит образцы цельной венозной крови 721 жителя г. Северска с ЗНО (233 мужчины и 488 женщин, средний возраст мужчин – $63,57 \pm 0,71$ года, женщин – $62,66 \pm 0,61$ года).

ББМ также содержит образцы цельной венозной крови 536 работников СХК, перенесших ОИМ (426 мужчин и 110 женщин, средний возраст мужчин – $62,45 \pm 0,53$ года, женщин – $69,22 \pm 0,64$ года). Из 536 работников СХК, перенесших ОИМ, 151 человек (129 мужчин и 22 женщины) подвергался только внешнему облучению, 43 человека (35 мужчин и 8 женщин) – только внутреннему облучению и 141 человек (123 мужчины и 18 женщин) – сочетанному облучению. Из 536 работников СХК, перенесших ОИМ, 201 человек (130 мужчин и 71 женщина) не подвергались облучению. ББМ содержит образцы цельной венозной крови 233 человек (111 мужчин и 122 женщин) жителей г. Северска, перенесших ОИМ.

Выводы: ББМ СБН Центра представляет собой уникальный ресурс БМ для исследований в различных областях радиобиологии, направленных на выяснение генетических эффектов техногенного радиационного воздействия низкой интенсивности, изучение генетических аспектов патогенеза социально значимых

неинфекционных заболеваний (прежде всего, онкологических и сердечно-сосудистых), а также для исследований в области радиационной и медицинской генетики.

Список литературы

1. Gemeinholzer B., Dröge G., Zetzsche H. [et al.] The DNA Bank Network: The Start from a German Initiative // Biopreservation and Biobanking. 2011. Vol. 9, №1. P. 51-55.
2. Kodama Y., Mashima J., Kaminuma E. [et al.] The DNA Data Bank of Japan launches a new resource, the DDBJ Omics Archive of functional genomics experiments // Nucleic Acids Research. 2012. Vol. 40. P. 38-42.
3. Sak J., Pawlikowski J., Goniewicz M., Witt M. Population biobanking in selected European countries and proposed model for a Polish national DNA bank // Journal of Applied Genetics. 2012. Vol. 53, № 2. P. 159-165.
4. Межеричкий С.А., Тахауов Р.М., Карпов А.Б. [и др.] Банк биологического материала здоровых работников Сибирского химического комбината // Медицина экстремальных ситуаций. 2013. Т. 1, № 43. С. 30-39.

РАЗРАБОТКА РАДИОЗАЩИТНЫХ И РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ФТОРИДА ЦЕРИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ.

К.А. Каменских¹, А.Л. Попов¹, А.М. Ермаков¹, В.К.Иванов²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), г. Пущино Московской обл., ²ФГБУН Институт общей и неорганической химии им. Н.С.

Курнакова, г. Москва, Россия, e-mail: kristina.kamensk@mail.ru

Резюме. Впервые показано, что наночастицы фторида церия (CeF_3) выступают в качестве радиосенсебилизатора для клеточной культуры остеосаркомы человека (MNNG/Hos) при воздействии рентгеновского излучения. При этом анализ фосфорилированных гистонов H2AX (γ -H2AX) выявил достоверное снижение количества двуцепочечных разрывов после воздействия ионизирующего излучения как в трансформированных клетках линии MCF-7, так и в нормальных мезенхимальных стволовых клетках (МСК).

Ключевые слова: наночастицы, фторид церия, радиосенсебилизатор, CeF_3

Summary. It has been shown for the first time that cerium fluoride (CeF_3) nanoparticles act as a radiosensitizer for human osteosarcoma (MNNG / Hos) cell line under X-ray expose. The analysis of phosphorylated histones H2AX (γ -H2AX) revealed a significant decrease in the number of double-stranded breaks after X-ray exposure both in transformed MCF-7 cells and in normal mesenchymal stem cells (MSCs).

Keywords: nanoparticles, cerium fluoride, radiosensitizer, CeF_3

В настоящее время использование наночастиц в медицине для диагностики и лечения заболеваний становится ключевой технологией. Наночастицы обладают уникальными свойствами, которые могут быть полезны в различных областях применения, и, следовательно, они вызывают значительный интерес. В частности, в области биомедицины интенсивно исследуются вопросы использования нановакцин и нанопрепаратов. Благодаря своим размерам наноматериалы обладают новыми и улучшенными физическими, химическими и биологическими свойствами. Поскольку размер таких материалов подобен размеру большинства биологических молекул, наноматериалы можно использовать как для биомедицинских исследований, так и для исследований *in vivo* и *in vitro*. Наночастицы уже широко используются для профилактики, диагностики и лечения рака. [1]

В последние годы было показано, что именно нанокристаллический оксид церия проявляет уникальные окислительно-восстановительные свойства вследствие высокой степени кислородной нестехиометрии его поверхности. Наноцерий обладает низкой токсичностью и высокой биосовместимостью, что делает его весьма перспективным биомедицинским материалом.

Наноматериалы на основе церия относятся к новому классу искусственных ферментов (нанозимов) [2] и способны поглощать различные активные формы кислорода (АФК). Ранее продемонстрировано, что именно ионы Ce^{3+} определяют его активность в окислительно-восстановительных реакциях. С другой стороны, Das et. al. [3] утверждают, что каталазоподобные свойства наноцерия существенно зависят от содержания на его поверхности ионов Ce^{4+} .

До сих пор остается открытым вопрос о том, могут ли другие церий содержащие наноматериалы защищать живые клетки от перекиси водорода или других активных

форм кислорода, когда ион церия изначально находится только в трёхвалентном состоянии. Хорошим кандидатом для этой цели являются наночастицы фторида церия.

Ранее было изучено, что наночастицы фторида церия защищают как органические молекулы, так и живые клетки от окислительного действия перекиси водорода и обеспечивают заметную защиту клеток от вируса везикулярного стоматита[4].

Наночастицы фторида церия синтезировали как описано в работе [5], в экспериментах наночастицы вносили непосредственно в культуральную среду ДМЕМ/Ф12 (ПанЭко, Россия), содержащую 10% эмбриональную телячью сыворотку производства NuClone. За сутки до облучения рентгеновским излучением в дозе 15 Гр наночастицы в концентрациях от 10^{-3} М до 10^{-7} М добавляли в клеточные культуры. С помощью МТТ-теста и микрофотометрического анализа с помощью флуоресцентных красителей (LIVE/DEAD assay) была проведена оценка их влияния на метаболическую активность и жизнеспособность клеточной культуры.

Показано, что при воздействии рентгеновского излучения наночастицы CeF_3 проявляют радиосенсибилизирующие свойства. Жизнеспособность клеток MNNG/Hos снижалась на 80% относительно контроля. При этом наночерий заметно увеличивает выживаемость МСК. Эффект составил порядка 50% относительно контроля при концентрации 10^{-3} М.

Для интактных культур клеток (не подвергнутых ионизирующему излучению) показано, что наночастицы CeF_3 в концентрациях от 10^{-3} М до 10^{-7} М практически не влияли на жизнеспособность МСК человека. Тогда как на культуре клеток MNNG/Hos наночерий оказывал угнетающее действие: жизнеспособность клеток снижалась на 60% относительно контроля при концентрациях от 10^{-4} М до 10^{-6} М.

Для выявления молекулярных механизмов действия наночастиц изучали их влияние на уровень двуцепочечных разрывов ДНК, индуцированных рентгеновским излучением. Для этого оценивали число двунитевых разрывов, путем окрашивания фосфорилированных гистонов [H2AX](#). Предварительно обработанные наночастицами культуры клеток MCF-7 и МСК были подвергнуты рентгеновскому излучению в дозе 15 Гр. Полученные данные говорят о том, что наночастицы в концентрациях 10^{-3} М и 10^{-7} М снижает количество двуцепочечных разрывов через 4 часа после облучения. Для MCF-7 радиозащитный эффект составляет порядка 20%, для МСК - порядка 10%. Таким образом, наночастицы фторида церия выступают в качестве генопротектора для обоих типов клеточных культур. Молекулярные механизмы такой селективной активности наночастиц в отношении нормальных и трансформированных клеток требуют дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90031.

Список литературы

1. Seigneuric R., Markey L., Nuyten D.S, Dubernet C., Evelo C.T., Finot E., Garrido C. From nanotechnology to nanomedicine: applications to cancer research.// *Curr. Mol. Med.* 2010. Vol. 10, №7. P. 640-652.
2. Wei H., Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. // *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42, №14. P. 6060-6093.
3. Das, S., Dowding, J. M., Klump, K. E., McGinnis, J. F., Self, W., & Seal, S. Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine. // *Nanomedicine.* 2013. Vol. 8, № 9. P. 1483-1508.

4. Shcherbakov, A. B., Zholobak, N. M., Baranchikov, A. E., Ryabova, A. V., Ivanov, V. K. Cerium fluoride nanoparticles protect cells against oxidative stress. // *Materials Science and Engineering: C*. 2015. Vol. 50. P. 151-159.

5. Ermakov A., Popov A., Ermakova O., Ivanova O., Baranchikov A., Kamenskikh K., Scherbakov A., Popova N., Ivanov V. The first inorganic mitogens: Cerium oxide and cerium fluoride nanoparticles stimulate planarian regeneration via neoblastic activation. // *Materials Science and Engineering: C*. 2019. Vol.104. P. 109924

НАЛИЧИЕ ИНТЕГРАЦИИ ДНК ВПЧ16 И ПРОГНОЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ II СТАДИИ.

Киселева В.И., Мкртчян Л.С., Крикунова Л.И. Любина Л.В., Безяева Г.П., Панарина Л.В., Липунов Н.М., Замулаева И.А.

МРНЦ им. А.Ф.Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, г. Обнинск, e-mail: kivapim@mail.ru

Резюме. 47 первичных ВПЧ16-положительных больных РШМ II стадии исследованы на наличие интеграции ДНК вируса в клеточный геном и в соответствии с результатами разделены на две группы: 1-ая с наличием интеграции ДНК ВПЧ16; во 2-ой интеграция ДНК вируса не выявлена. Различия между группами по клинико-морфологическим характеристикам опухоли и возрастному составу больных – статистически незначимы ($p=0,72$; $0,48$; $0,26$; $0,60$; $0,55$; $1,0$ соответственно, критерии Фишера, χ^2 , Уитни-Манна). Показатели безрецидивной и общей выживаемости в 1-ой группе значимо ниже, чем во 2-ой ($p=0,0096$ и $0,024$ соответственно, критерий Каплан-Мейер и log-rank тесту). Относительный риск неблагоприятного исхода заболевания в группе с наличием интеграции ДНК ВПЧ16 на сроке 3 г. составил 8,6 (95% ДИ 1,1; 67,3), AUC=0,77.

Ключевые слова: рак шейки матки, геном, интеграция ДНК ВПЧ16.

THE HPV-16 DNA INTEGRATION AND PROGNOSIS OF TREATMENT EFFICIENCY OF CERVICAL CARCINOMA STAGE II.

Kiseleva V. I., Mkrтчyan L. S., Krikunova L. I. Lyubina, L. V., G. P. Bezyaeva, Panarina L. V., Lipunov N. M. Zamulaeva I. A.

MRRC by A.F.Tsyb – branch of FSBI “NMRC of Radiology” of Health Ministry of Russia, Obninsk, Russia, e-mail: kivapim@mail.ru

Summary. 47 primary HPV16-positive patients with cervical cancer stage II was examined for the integration of virus DNA in the cellular genome, and in accordance with the results divided into two groups: 1st with integrated DNA HPV16; 2nd, integration of the virus DNA was not detected. The differences between the groups according to the clinical and morphological characteristics of the tumor and age composition of the patients was statistically insignificant. The indicators of disease-free and overall survival in group 1 are significantly lower than in group 2 ($p=0.0096$ and 0.024 , respectively, Kaplan-Meier and log-rank test). The relative risk of adverse disease outcome in the group with HPV 16 DNA integration was 8,6 (95% CI 1.1; 67.3) at periods up to 3 years, AUC=0.77.

Key words: cervical cancer, genome, HPV16 DNA integration

Причинно-следственная связь персистенции вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска с раком шейки матки (РШМ) убедительно доказана. В подавляющем большинстве случаев вирус элиминируется иммунной системой организма, однако, примерно у 5% инфицированных женщин через несколько лет (иногда десятков лет) может развиваться инвазивный РШМ [1, 2]. РШМ продолжает занимать одно из ведущих мест среди злокачественных новообразований и имеет стойкую тенденцию к росту у молодых женщин. Высокий удельный вес местнораспространенных форм заболевания приводит к неуклонному росту смертности от данного заболевания [3]. Все это диктует необходимость поиска эффективных маркеров прогноза течения и клинического исхода заболевания с последующей индивидуализацией подходов к лечению. К числу таких маркеров относятся молекулярно-генетические показатели вируса папилломы. Канцерогенное

прогрессирование, как правило, сопровождается интеграцией вирусного генома в геном клетки хозяина, что приводит к нарушению открытой рамки считывания вирусного гена E2 [4,5]. Белок e2 контролирует экспрессию вирусных онкогенов E6/E7, которые управляют клеточным циклом и способностью клетки подвергаться апоптозу [6]. Нарушение регуляции клеточного цикла в свою очередь может повлечь за собой резистентность опухолевых клеток к терапии [5, 7]. Ранее нами было показано, что интеграция ДНК ВПЧ16 в клеточный геном в 4 раза повышает риск негативного исхода заболевания РШМ III стадии [8]. Целью настоящей работы явился анализ значимости маркера наличия/отсутствия интеграции ДНК ВПЧ в геном клетки-хозяина для прогноза клинического исхода РШМ II стадии.

Исследуемую группу составили 47 первичных ВПЧ16-позитивных больных с морфологически верифицированным РШМ II стадии, которым проводилась сочетанная лучевая/химиолучевая (ЛТ/ХЛТ) терапия. Наличие и генотип ВПЧ ВКР, наличие интеграции ДНК вируса ВПЧ16 в клеточный геном выявляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в объединенных соскобах из цервикального канала и наружной поверхности шейки матки, взятых у больных до лечения. Анализ выполняли на амплификаторе «RotorGene» («Corbett Research», Австралия) с использованием отечественных коммерческих тест-систем «АмплиСенс-скрин-тирт FL» «АмплиСенс генотип-титр FL» и наборов реактивов для выявления интеграции вирусной ДНК [9] ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Оценку эффективности противоопухолевой терапии проводили по показателям прогрессирования заболевания и летальных исходов на сроках 2г, 3г и 5л после окончания лечения. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «Statistica 13.0».

В соответствии с данными о физическом статусе вируса сформированы 2 клинические группы: 1-ая - с наличием интеграции ДНК ВПЧ16; во 2-ой - интеграция ДНК вируса не выявлена. Группы проанализированы по морфологической структуре, степени дифференцировки, форме роста и варианту распространения опухоли, а также по характеру лечения, первичному ответу на терапию, возрасту больных. В обеих группах в подавляющем большинстве случаев (выше 95%) выявлен плоскоклеточный рак и по одному случаю аденокарциномы. Опухоли с низкой степенью дифференцировки, с эндофитной и смешанной формой роста опухоли, с наличием параметральной инфильтрации чаще встречаются в группе больных, у которых интеграции ДНК вируса не выявлена. Однако различия между группами по этим показателям незначимы ($p=0,48$; $0,26$ и $0,60$ соответственно, критерий Фишера и χ^2). Пациентки с наличием интеграции вирусной ДНК чаще получали ХЛТ, но и в этом случае различия между группами незначимы ($p=0,33$, критерий χ^2). Также не различаются значимо представленные группы по уровню первичной регрессии опухоли после окончания радикального курса терапии ($p=0,55$, критерий χ^2). Практически одинаково пациентки в обеих группах распределены по возрастному составу ($p=1,0$, критерий Манна-Уитни). В то же время частота прогрессирования заболевания и летальных исходов у больных с наличием интеграции вирусной ДНК оказалась значимо выше. На сроке 2 г. она составляет 35% по сравнению ремиссией заболевания у всех больных в группе с отсутствием интеграции ДНК ВПЧ ($p=0,0024$ критерий Фишера). Во 2-ой группе прогрессирование обнаружено только у одной пациентки (4,7%) на сроке 3 г. Показатели безрецидивной и общей выживаемости в 1-ой группе были значимо ниже, чем во 2-ой ($p=0,0096$ и $0,024$ соответственно согласно критерию Каплан-Мейер и log-rank тесту). Относительный риск неблагоприятного исхода заболевания в группе с наличием интеграции ДНК ВПЧ16 на сроке 3 г. составил 8,6 (95% ДИ 1,1; 67,3), AUC=0,77.

Полученные данные позволяют полагать, что наличие интеграции ДНК ВПЧ16 в клеточный геном может служить эффективным маркером прогноза неблагоприятного клинического исхода РШМ II стадии.

Список литературы.

1. Forman D, de Martel C, Lacey CJ et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases // *Vaccine* . – 2012. - V. 5 – P. 12–23.
2. Silveira F.A., Almeida, G., Furtado, Y.L. et al. The association of HPV genotype with the regression persistence or progression of low-grade squamous intraepithelial lesions // *Exp. Mol. Pathol.* – 2015. - V. 99 – P. 702-706.
3. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой, Москва
4. Li H., Yang Y., Zhang R. et al. Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions. – 2013. – Vol. 56. – P. 342-347.
5. Li P., Tan Y., Zhu L.X., et al. Prognostic value of HPV DNA status in cervical cancer before treatment: a systematic review and meta-analysis // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. –P. 66352-66359.
6. Lindel K, Rieken S, Daffinger S, et al. The transcriptional regulator gene E2 of the Human Papillomavirus (HPV) 16 influences the radiosensitivity of cervical keratinocytes // *Radiat Oncol.* – 2012. – V. 7. – P. 187.
7. Vozenin MC, Lord NK, Hartl D. et al. Unravelling the biology of human papillomavirus (HPV) related tumours to enhance their radiosensitivity // *Cancer Treat Rev.* – 2010. – Vol. 36. – P. 629-636.
8. Киселева В.И., Мкртчян Л.С., Иванов С.А. и др. Наличие интеграции ДНК вируса папилломы человека 16 типа и прогноз неблагоприятного исхода рака шейки матки III стадии // *Бюллетень экспериментальн. биолог. и медицины.*- 2019.- №7.- Стр.100-105.
9. Куевда Д.А., Ермакова Н.В., Шипулина О.Ю. и др. Высокая вирусная нагрузка и интеграция ВПЧ в геном человека как молекулярные маркеры диспластических изменений шейки матки. // *Сб. трудов 6-ой всероссийской научно-практической конференции.*- 2007.-Т.III.- С.130-132.

ДЕЙСТВИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ И ПРОТОНОВ НА САРКОМУ М-1 КРЫС

А.Е.Корецкая, В.В.Южаков, К.С.Корчагина, Н.К.Фомина, С.Н.Корякин, А.Н.Соловьев, М.Г.Цыганова, И.Э.Ингель, Л.Е.Севанькаева, Н.Д.Яковлева, Ю.С.Романко
Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф.Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава РФ, Обнинск, Россия, e-mail: yuzh_vad@mail.ru

Резюме. Изучали эффективность воздействия γ - и протонного излучений в дозах 32 Гр на морфологию соединительнотканной опухоли крыс. Методы исследования включали определение митотической активности и апоптотической гибели опухолевых клеток, а также компьютерный анализ микроскопических изображений. Согласно полученным данным, более высокая эффективность лучевой инактивации опухолевых клеток при воздействии протонами обусловлена индукцией патологических митозов и апоптоза.

Ключевые слова: γ -излучение, протоны, саркома М-1, противоопухолевая эффективность, патологические митозы, апоптоз.

EFFECT OF GAMMA RADIATION AND PROTONS ON RAT SARCOMA M-1

A.E.Koretskaya, V.V.Yuzhakov, K.S.Korchagina, N.K.Fomina, S.N.Koryakin, A.N.Solovev, M.G.Tsyganova, I.E.Ingel, L.E.Sevankaeva, N.D.Yakovleva, Yu.S.Romanko
A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of FSBI NMRRC of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, e-mail: yuzh_vad@mail.ru

Summary. The effects of γ - and proton radiation at doses of 32 Gy on the morphology of rat connective tissue tumors were studied. Research methods included the estimation of the mitotic activity and apoptotic death of tumor cells, as well as computer analysis of the microscopic images. According to the obtained data, the higher efficiency of radiation inactivation of tumor cells when exposed to protons is due to the induction of pathological mitoses and apoptosis.

Key words: γ -radiation, protons, M-1 sarcoma, antitumor efficacy, pathological mitoses, apoptosis.

В последние годы в радиационной онкологии все чаще и успешно применяется протонная терапия (ПТ). Основные предпосылки использования ПТ для злокачественных новообразований основаны на уникальных характеристиках глубинного распределения поглощенной дозы протонов с максимумом в пике Брэгга и быстрым спадом дозы за ним. Совмещение нескольких пиков Брэгга по глубине позволяет создать так называемую модифицированную кривую Брэгга и обеспечить конформное облучение опухоли [1]. Таким образом становится возможным более точное следование пучка по форме и глубине новообразования, что позволяет поражать опухолевые клетки, не затрагивая при этом окружающие здоровые ткани.

ПТ можно использовать для эскалации доз лучевой нагрузки на опухоли и снижения дозы облучения нормальных тканей, расположенных проксимально и дистально относительно облучаемой опухоли, что потенциально улучшает локальный контроль и выживаемость пациентов, одновременно снижая радиотоксичность и улучшая качество жизни [2]. Считается, что протонные пучки особенно эффективны для радиотерапии неоплазий, расположенных близко к критическим, радиочувствительным органам, а при лечении опухолей у детей – обеспечивают снижение интегральной дозы ионизирующего излучения на организм [3].

Хотя физические свойства протонных пучков относительно хорошо изучены, все еще остаются вопросы относительно их биологической эффективности. Так, в

настоящее время в ПТ принято постоянное значение ОБЭ протонов, равное 1,1, независимо от физических свойств протонных пучков и биологических систем [3]. Однако данные литературы, обобщенные в обзоре [4] показывают, что ОБЭ протонов по отношению к γ -излучению ^{60}Co варьирует от 0,8 до 1,7 и зависит от уровня дозы и энергии протонов, величины линейной передачи энергии и типа биологического объекта.

Цель исследования: изучить сравнительную эффективность γ - и протонного излучений на морфологические характеристики радиорезистентной соединительнотканной опухоли, перевиваемой крысам [5].

Материалы и методы. Работа выполнена на самцах белых беспородных крыс с имплантированной под кожу голени саркомой М-1. Животные с развившимися опухолями методом рандомизации были распределены на три группы – контрольную и 2 опытные по 5 особей в каждой. Опухоли крыс контрольной группы не подвергались воздействиям. В 1-ю опытную группу вошли крысы, опухоли которых подвергали локальному воздействию γ -излучения ^{60}Co на установке «Луч» в дозе 32 Гр. Опухолевые узлы животных 2-й группы облучали протонами в дозе 32 Гр на пучке терапевтического комплекса «Прометеус» (Обнинск). Энергия протонов в сканирующем пучке варьировала от 75 до 93,7 МэВ. Облучение начинали на 12 сутки после имплантации саркомы при достижении опухолевыми узлами объемов 1,2-2,4 см³.

Критерием эффективности действия излучений являлась динамика изменения коэффициента роста опухолей: $KPO = (V_{ti} - V_0)/V_0 \times 100$ (%), где V_{ti} – объем опухоли (см³) на i сутки от начала облучения, а V_0 – объем опухоли в день облучения. Животных выводили из опытов через 6 сут от начала облучения.

Опухоли выделяли под тиопенталовым наркозом. Ткань опухоли фиксировали в кислой жидкости Буэна, обезвоживали и заливали в «Гистомикс». Для морфологических исследований микротомные срезы опухолевых узлов толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (БиоВитрум).

Объемное содержание жизнеспособной паренхимы опухолей ($V_{по}$) как отношение суммарных площадей паренхимы без зон некроза/деструкции ткани к общей площади среза опухолевого узла рассчитывали с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений с применением программного обеспечения Leica Application Suite. Количественную плотность опухолевых клеток (клеточность, $N_{ок}$) по числу их сечений на 1 мм² площади среза, митотические индексы и индекс апоптоза ($I_{ап}$) определяли при иммерсионном увеличении микроскопа в тестовых полях общей площадью не менее 0,5 мм².

Коэффициенты эффективности ($K_{эфф}$) действия γ -излучения и протонов на саркому М-1 определяли путем нормирования показателей на 1 Гр подведенной дозы [5]. ОБЭ протонов рассчитывали по отношению нормированных коэффициентов эффективности для протонов и γ -излучения. Для статистической обработки полученных результатов использовали непараметрический U критерий Манна-Уитни. Межгрупповые различия рассматривали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты. На 6 сут от начала экспериментов КРО у животных контрольной группы составил $2,60 \pm 0,41$. Паренхима опухолей просматривалась в виде солидных тяжелей неравномерной ширины по периферии опухолевых узлов. Характерной чертой ангиоархитектоники саркомы являлась обильная васкуляризация периферических участков, прилегающих к подкожной клетчатке. В опухолевых узлах зоны спонтанного некроза (ЗН) занимали $21,7 \pm 4,7\%$, а $V_{по}$ – $78,3 \pm 4,7\%$. По данным морфометрии, у особей контрольной группы $N_{ок}$ составила 5144 ± 118 на 1 мм². Индексы нормальных и патологических митозов ($I_{пм}$) были равны $1,58 \pm 0,31$ и $0,49 \pm 0,06\%$, а $I_{ап}$ – $0,27 \pm 0,09\%$.

Согласно полученным данным, на 6 сут после воздействия γ -излучения в дозе 32 Гр КРО снизился до $-0,17 \pm 0,09$. Снижение скорости роста опухолей сопровождалось уменьшением ЗН и увеличением $V_{\text{ПО}}$ до $96,1 \pm 0,38\%$. В то же время $N_{\text{ОК}}$ снизилась относительно контроля в 2,7 раза до 1891 ± 95 на 1 мм^2 , а $I_{\text{ПМ}}$ и $I_{\text{АП}}$ статистически значимо увеличились в 7,3 ($3,50 \pm 0,23\%$) и 11,7 раз ($3,16 \pm 0,29\%$) соответственно. В паренхиме выявлялись многочисленные многоядерные клетки и «лучевые гиганты». При гистологическом исследовании опухолей, подвергнутых воздействию γ -излучения, обращало на себя внимание, что зоны максимального лучевого повреждения в результате снижения клеточности отчетливо контурировались более светлым окрашиванием паренхимы и располагались в виде узких полос шириной от 1 до 1,5 мм по периферии опухолей, хорошо васкуляризированной у крыс контрольной группы.

На 6 сут после воздействия протонным излучением КРО снизился до $-0,30 \pm 0,08$, а клеточность паренхимы уменьшилась до 1523 ± 175 на 1 мм^2 ($p > 0.05$ относительно 1-й опытной группы). Однако $I_{\text{ПМ}}$ и $I_{\text{АП}}$ увеличились статистически значимо в сравнении с этими показателями при действии γ -излучения до $4,63 \pm 0,42$ и $4,90 \pm 0,46\%$. Отчетливо регистрировалось увеличение содержания патологических митозов с рассеиванием в цитоплазме фрагментов хромосом, свидетельствующем о необратимом повреждении опухолевых клеток путем их ухода в митотическую катастрофу. При этом зоны максимального повреждения паренхимы саркомы визуализировались не только по периферии опухолевых узлов, но и в их центральных отделах.

Сравнительный анализ Кэфф действия γ -квантов ^{60}Co и протонного излучения показал, что расчетные значения ОБЭ протонов по снижению количественной плотности опухолевых клеток, увеличению содержания патологических митозов и индуцированному апоптозу составили 1,1; 1,4 и 1,6 соответственно. Не исключено, что увеличение эффективности протонов по снижению клеточности всего лишь на 10% было обусловлено недостаточным удалением погибших клеток из зон лучевого повреждения на данный срок исследования.

Заключение. Результаты проведенных нами исследований позволяют сделать вывод о том, что в режиме однократного облучения саркомы М-1 противоопухолевая эффективность γ -излучения и протонов определяется разным уровнем индукции патологических митозов и гибели клеток путем апоптоза.

Список литературы

1. Бушманов А.Ю., Шейно И.Н., Липенгольд А.А., Соловьев А.Н., Корякин С.Н. Перспективы применения комбинированных технологий в протонной терапии злокачественных новообразований // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Том 64, № 3. С. 11–18.
2. Mohan R., Grosshans D. Proton therapy – present and future // Adv. Drug Deliv. Rev. 2017. Vol. 109. P. 26–44.
3. 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, № 3. P. 580–588.
4. Иванов А.А., Бычкова Т.М., Никитенко О.В., Ушаков И.Б. Радиобиологические эффекты протонов // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Том 64, № 3. С. 19–31.
5. Южаков В.В., Севанькаева 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. Том 53, № 3. С. 267–279.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ В КЛЕТКАХ V-79 ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТОНОВ, ИОНОВ УГЛЕРОДА И ВТОРИЧНЫХ ТЯЖЕЛЫХ ЗАРЯЖЕННЫХ ЧАСТИЦ

*Е.В. Корякина, М.В. Трошина, В.И. Потетня, Р.М. Байкузина,
С.Н. Корякин, А.А. Лычагин*

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба –
филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, г. Обнинск, Россия,
ek-koryakina@mrrc.obninsk.ru

Резюме. В экспериментах *in vitro* исследовали восстановление клеток V-79 от радиационных повреждений после однократного и фракционированного облучения протонами, ионами углерода и вторичными частицами с высокими ЛПЭ, образуемыми быстрыми нейтронами. Выживаемость клеток не изменялась или несколько снижалась в пострadiационный период (0-24 ч) и между фракциями доз (0-6 ч) при действии ионов углерода и вторичных частиц, но увеличивалась с одинаковой кинетикой при действии протонов и γ -излучения ^{60}Co .

Ключевые слова: выживаемость, пострadiационное восстановление, протоны, ионы углерода, вторичные частицы (нейтроны)

DAMAGE REPAIR IN V-79 CELLS AFTER EXPOSURE TO PROTONS, CARBON IONS, AND SECONDARY HEAVY CHARGED PARTICLES

E.V. Koryakina, M.V. Troshina, V.I. Potetnya, R.M. Baykuzina, S.N. Koryakin, A.A. Lychagin
A. Tsyb Medical Radiological Research Center –

branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, ek-koryakina@mrrc.obninsk.ru

Summary. Experiments *in vitro* on V-79 cell recovery from radiation damage following single and fractionated exposure to protons, carbon ions, and secondary high-LET particles produced by fast neutrons were carried out. During post-irradiation (0-24 h) or inter-fraction (0-6 h) time interval cell survival was observed to be nearly constant or slightly decreasing after exposure to carbon ions and high-LET secondaries but increased with a similar kinetics in the case of proton and ^{60}Co radiation treatment,

Key words: survival, post-irradiation recovery, protons, carbon ions, secondary particles (neutrons)

Основные виды лучевой терапии – фотонную, протонную, а также развивающуюся перспективную ионную, в основном применяют как самостоятельный способ радиационного воздействия. В отличие от этого распространенная в 90-е гг. нейтронная терапия применялась в схемах сочетанной радиотерапии, что позволяло использовать такой подход для воздействия на радиорезистентные опухоли, минимизируя при этом осложнения, обусловленные высокой ОБЭ нейтронов. Аналогичный указанному подход был реализован в 2003-2016 гг., когда вышел ряд работ по сочетанной углеродно-фотонной терапии, где ионная терапия применялась в качестве буста к фотонной IMRT. В развитие этого направления нами предлагается сочетать два высоко конформных вида терапии – протонную и ионную, и начать исследование оптимальных схем их воздействия на клеточные популяции.

Целью настоящей работы было исследование восстановления клеток китайского хомячка V-79 от радиационных повреждений после однократного и фракционированного воздействия протонов, ионов углерода и вторичных тяжелых заряженных частиц. Установление временных характеристик пострadiационного роста

популяции клеток при облучении на конкретных источниках терапевтического назначения является важным этапом перед их совместным применением.

Эксперименты с воздействием протонов проводили на протонном ускорителе «Прометеус» (ЗАО «Протом», МРНЦ им. А.Ф. Цыба, г. Обнинск). Монослой клеток облучали с двух направлений (0° , 180°) сканирующим пучком протонов с энергиями 95,5–135,5 МэВ в дозах 6,5 и 13 Гр при однократном воздействии и в дозах по 4,5 Гр при фракционировании. При этом флакон с клетками, полностью заполненный раствором Хэнкса, находился в специальном держателе в водном фантоме. Перед облучением выполняли томографию заполненного средой флакона, проводили оконтуривание объекта (монослоя клеток) и создавали план облучения, который использовали во всех повторных опытах.

Эксперименты с ионами углерода выполняли на ускорителе У-70 (НИЦ «Курчатовский институт» – ИФВЭ, г. Протвино). Во время импульсного (длительность импульса – 0,6 с) облучения ускоренными ионами флаконы с клетками находились в водном фантоме. Монослой клеток облучали в двух положениях по ходу углеродного пучка: на начальном участке кривой Брэгга (плато) и в центре немодифицированного пика Брэгга. Глубинное дозовое распределение измеряли посредством цилиндрической ионизационной камеры с дозиметром ДКС–АТ5350/1. Энергия ионов на входе в фантом составляла ~ 425 МэВ/нуклон, средняя ЛПЭ излучения на начальном участке составляла ~ 10 – 12 кэВ/мкм, в пике Брэгга ~ 180 кэВ/мкм. Дозы при облучении ионами углерода составили 6 Гр и 1, 2, 3,5 Гр для плато и пика соответственно. При облучении флаконы с монослоем клеток располагали вертикально, перпендикулярно пучку ионов.

Исследование действия вторичных тяжелых заряженных частиц (ТЗЧ) проводили с использованием уникальной методики облучения на нейтронном генераторе непрерывного действия НГ-14 [1]. Для получения ТЗЧ монослой клеток облучали нейтронами со средней энергией 14,5 МэВ через стеклянную подложку (дно флакона Карреля) толщиной 1 мм. В этом случае в слое клеток создаются условия отсутствия равновесия вторичных заряженных частиц, и основной вклад в дозу делают не протоны (как в условиях равновесия), а тяжелые короткопробежные ядра отдачи (ЯО) С, N, O, α -частицы, обладающие характеристиками, сходными с ускоренными ионами в пике Брэгга. Определение кермы нейтронов проводили экспериментальными методами с применением твердотельной трековой дозиметрии и метода активационного анализа. Дозы ТЗЧ определяли расчетно-экспериментальными методами, они составили около 1,4 Гр.

Закономерности восстановления клеток от повреждений при действии протонов, ионов углерода и вторичных ТЗЧ сравнивали с воздействием стандартного γ -излучения (^{60}Co , $E_{\text{ср}} = 1,25$ МэВ, мощность дозы ~ 1 Гр/мин) в изоэффективных дозах 5 и 6 Гр. Все исследования выполнены на клетках, находящихся в стационарной фазе роста.

Во время облучения и после него до посева или повторного облучения клетки находились в обедненной среде при температуре 37°C разное время (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 ч), затем проводили их посев в питательную среду и инкубировали в течение 8–10 дней до формирования колоний.

Результаты исследования показали, что после воздействия протонов в дозах 6,5 и 13 Гр восстановление клеток от повреждений наблюдается в интервале от 0 до 4 ч, его закономерности аналогичны действию γ -излучения, период полувосстановления во всех случаях близок к 1 ч. Напротив, при облучении ионами углерода на плато и в пике Брэгга и ТЗЧ при нейтронном воздействии в неравновесных условиях пострадиационное восстановление клеток от повреждений не проявлялось. Полученный эффект обусловлен значительным вкладом частиц с высокими значениями ЛПЭ в дозу, что приводит к индукции нерепарируемых повреждений в клетках

(например, кластеров двойных разрывов ДНК). Так, большая часть суммарной дозы при облучении в пике Брэгга обусловлена ионами ^{12}C , из которых 60–70 % характеризуются величинами ЛПЭ в среднем выше 130 кэВ/мкм. При действии нейтронов в неравновесных условиях основной вклад в дозу (~80 %) делают ядра отдачи C, N, O (~ 460 кэВ/мкм) и α -частицы (140 кэВ/мкм).

Закономерности межфракционного восстановления повреждений при делении дозы на две равные части аналогичны закономерностям пострадиационного восстановления. При действии протонов и стандартного γ -излучения процессы восстановления повреждений полностью завершаются к 4–5 ч перед повторным воздействием, период полувосстановления повреждений составляет около 1,5 ч. При фракционировании дозы ТЗЧ, как и в случае с однократным воздействием, восстановление клеток от повреждений не проявляется, что согласуется с данными работ [2; 3] для ионов ^{12}C , ^{16}O , подтверждая тот факт, что при облучении монослоя клеток нейтронами (14,5 МэВ) в условиях отсутствия равновесия вторичных частиц основной вклад в дозу и в биологический эффект делают тяжелые ядра отдачи, обладающие сходными характеристиками с ускоренными ионами в пике Брэгга и индуцирующие в клетках трудно- или нерепарируемые повреждения ДНК.

Аналогичный ход кривых восстановления при однократном и фракционированном воздействии каждого вида излучения может свидетельствовать о том, что восстановление обусловлено репарацией одного и того же вида повреждений – ОР и ДР ДНК, а также их кластеров. Со временем эти повреждения элиминируются системами репарации (негомологичной, гомологичной, микрогомологичной и др.). Скорость восстановления будет зависеть от сложности повреждений: простых разрывов ДНК или их кластеров. Сложность повреждений, в свою очередь, зависит от ЛПЭ излучения: чем выше ЛПЭ, тем больше относительное число кластеров ДР ДНК.

Сходство закономерностей восстановления при действии γ -излучения и протонов в близких дозах позволяет предположить, что в обоих случаях происходит образование однопипных повреждений, на репарацию которых уходит примерно одинаковое время. При действии ТЗЧ с высокими величинами ЛПЭ время репарации повреждений должно увеличиваться. Полученное в настоящей работе отсутствие восстановления при действии ТЗЧ указывает на образование или нерепарируемых повреждений, или повреждений, на восстановление которых требуется такое количество времени, которое методом клоногенной активности нельзя установить (больше продолжительности клеточного цикла).

Таким образом, качественный состав излучений, использованных в работе, в изученном диапазоне доз является определяющим фактором пострадиационного восстановления клеток от радиационных повреждений. Полученные результаты являются первым этапом исследований эффектов смешанных радиационных полей, важных для лучевой терапии.

Список литературы

1. Лычагин А.А., Корякина Е.В., Ульяненко С.Е. Дозиметрия смешанных гамма-нейтронных радиационных полей на малогабаритных генераторах импульсивного и непрерывного нейтронного излучения // Медицинская физика. 2015. № 3. С. 15–23.
2. Tolkendorf, E., Eichhorn, K. Effect of ionizing radiation of different linear energy transfer on the induction of cellular death and of chromosomal aberrations in cells of Chinese hamster // *StudiaBioph.* 1983. V. 95, No 1. P. 43–56.
3. Tommasino, F., Scifoni, E., Durante, M. New Ions for Therapy // *International Journal of Particle Therapy.* 2015. DOI 10.14338/IJPT-15-00027.1.

НОВЫЙ МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА КЛЕТКИ ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ

Е.А. Красавин¹, А.В. Борейко¹, И.А. Замулаева²

¹.Объединённый институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия; albor@jinr.ru

². ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, г. Обнинск, Россия

Резюме. В Лаборатории радиационной биологии Объединённого института ядерных исследований (ЛРБ ОИЯИ), разработан принципиально новый метод усиления биологической эффективности пучков протонов медицинского назначения и гамма-терапевтических установок. В экспериментах *in vitro* установлено, что при действии ионизирующих излучений на клетки человека в присутствии 1-β-D-арабинофуранозилцитозина (АраЦ) и гидроксимочевины (ГМ) - официальных препаратов, используемых в онкологической клинике, происходит трансформация *одонитевых разрывов ДНК* в *летальные двунитевые разрывы*, что приводит к резкому возрастанию гибели клеток.

На основе полученных результатов группой специалистов ЛРБ ОИЯИ и МРНЦ им. А.Ф. Цыба (Обнинск) были выполнены исследования эффективности предложенного метода при лечении меланомы. Группе животных (мыши) была привита опухоль меланомы и опухоль подвергалась облучению протонами в пике Брэгга в группе с введением препарата и без его введения. На 30 сутки контрольные животные без облучения погибли. На 40 сутки обе группы облученных животных живы и различия в размере опухолей в группах: облучение протонами и облучение протонами + Ара Ц достигает ~ 2,5 ÷ 3 раза. Применение предложенного подхода, обеспечивающего существенное повышение биологической эффективности пучков протонов и гамма-терапевтических установок, значительно сближает области использования протонных и углеродных ускорителей для терапевтических целей. Получен патент на изобретение нового метода усиления радиационного воздействия на живые клетки.

NEW METHOD FOR INCREASING THE EFFECTIVENESS OF ACTION OF IONIZING RADIATION ON TUMOR TISSUE CELLS

E.A.Krasavin¹, A.V.Boreyko¹, I.A.Zamulaeva²

¹Joint Institute for Nuclear Research (JINR), Dubna, Russia; albor@jinr.ru

²National Medical Research Centre of radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

At the Laboratory of Radiation Biology of the Joint Institute for Nuclear Research (LRB JINR), a fundamentally new method has been developed to enhance the biological efficiency of medical proton beams and gamma-therapeutic units. The approach is based on the use of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (AraC) and hydroxyurea (HU), the medicaments used in an oncological clinic. *In vitro* experiments have established that under the action of ionizing radiation on human cells in the presence of this drug, *transformation of single-stranded DNA breaks into lethal double-stranded breaks* occurs, which leads to a sharp increase in cell death.

Based on the results obtained, a group of specialists from the LRB JINR and the A.Tsyb MRNC (Obninsk) carried out studies of the effectiveness of the proposed method in the treatment of melanoma. A group of animals (mice) was inoculated with a melanoma tumor and the tumor was exposed to protons at the Bragg peak in the group with and without

drug administration. . On day 30, control animals died without irradiation. On day 40, both groups of irradiated animals are alive and differences in the size of tumors in the groups: proton irradiation and proton irradiation + the drug reaches ~ **2.5 ÷ 3** times. The method makes it possible to approximate the biological effectiveness of proton irradiation to the efficiency of irradiation with carbon ions. A patent has been obtained for the invention of a new method for enhancing the radiation effect on living cells.

**РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ
ЭНДОГЕННОГО СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА КАК ВОЗМОЖНОГО
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО МАРКЕРА РАДИОЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ
ИНГИБИТОРОВ NOS**

*М.Ю. Ксендзук, В.И. Суринова, А.А. Шитова, О.В. Солдатова, Л.И. Шевченко,
А.С. Филимонов, А.С. Сабурова, М.В. Филимонова*

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия, e-mail: m.ksendzuk@inbox.ru

Резюме: Была изучена эффективность ингибирования синтазы оксида азота разработанными в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба перспективными противолучевыми средствами. Данные, полученные адаптированной электрохимической методикой качественно воспроизводили результаты, полученные ранее, что свидетельствует о применимости данной методики в качестве экспресс-теста.

Ключевые слова: Ингибиторы NOS, фармакологические маркеры, метаболиты оксида азота, противолучевые средства.

**DEVELOPMENT OF A RAPID METHOD FOR ASSESSING THE ACTIVITY
OF ENDOGENOUS NITRIC OXIDE SYNTHESIS AS A POSSIBLE
PHARMACOLOGICAL MARKER OF RADIOPROTECTIVE ACTION OF NOS
INHIBITORS**

M.Yu. Ksendzuk, V.I. Surinova, A.A. Shitova, O.V. Soldatova, L.I. Shevchenko, A.S. Filimonov, A.S. Saburova, M.V. Filimonova

A.Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, e-mail: m.ksendzuk@inbox.ru

Abstract: The efficiency of inhibition of nitric oxide synthase developed in the laboratory of radiation pharmacology of A. Tsyb MRRC promising anti-radiation agents. The data obtained by the adapted electrochemical technique qualitatively reproduced the results obtained earlier, which indicates the applicability of this technique as an express test.

Key words: NOS inhibitors, pharmacological markers, nitric oxide metabolites, anti-radiation agents.

При разработке новых радиозащитных средств одним из условий, необходимых для их регистрации в качестве лекарственных препаратов, является наличие доказанных и верифицированных фармакологических маркеров их радиомодифицирующего действия. В последние годы в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба показана высокая противолучевая эффективность ряда химических ингибиторов синтаз оксида азота (NOS). Для полноценного проведения доклинических и клинических исследований в настоящее время ведется поиск метаболитов, приемлемых в качестве маркеров эффективности этих соединений и способов их верификации.

Цель исследования: Адаптация лабораторных методик, приемлемых в качестве экспресс тестов для оценки NOS-ингибирующей активности *in vivo*, как возможного фармакологического маркера радиозащитного действия химических соединений.

Материалы и методы: NOS-ингибирующая активность оценивалась по содержанию метаболитов оксида азота в гомогенате печени мышей. Для измерения их концентрации была адаптирована методика электрохимического измерения

нитратов/нитритов с применением ион-селективного электрода ISO-NOP 2mm.

Результаты и обсуждение: Результаты, полученные в проведенных экспериментах, качественно воспроизводили дозозависимую NOS-ингибирующую активность соединений T1023 и T1082, показанную другими «стандартными» методами: радиометрическим и ЭПР спектрометрическим.

Выводы: Измерения не требовали дорогостоящего оборудования и специальных условий для выполнения работ, что, по нашему мнению, свидетельствует о применимости данной методики в качестве экспресс-теста.

ЛУЧЕВЫЕ ПНЕВМОФИБРОЗЫ: КОРРЕЛЯЦИИ СУПРЕССИИ ИММУНИТЕТА С РЕГУЛЯТОРНЫМИ Т-КЛЕТКАМИ

Е.Г. Кузьмина, Т.Ю. Мушкарина, Т.В. Константинова

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Россия, e-mail: kuzmina_e_g@mail.ru

Резюме. При пневмофиброзах выявлена иерархия компонентов иммунитета: Т-лимфоцитов, клеток памяти, активационного статуса, инициации апоптоза популяции лимфоцитов, общих Т-клеток и Т-хелперов, соотношения Т-хелперов и Т-киллеров, пролиферации Т-лимфоцитов; уровня В- и NK-клеток; состояния фагоцитоза. Корреляционные связи отражают степень супрессии регуляторными Т-клетками субпопуляций лимфоцитов, процессов активации и гибели Т-лимфоцитов, регенеративного потенциала (уровня наивных лимфоцитов и Т-клеток), повышенной гибели лимфоцитов, развитие и рецидивирование воспалительных процессов.

Ключевые слова: Пневмофиброз, супрессорные регуляторные Т-клетки, нарушения иммунитета

RADIATION PNEUMOFIBROSIS: CORRELATIONS OF IMMUNE SUPPRESSION WITH REGULATORY T-CELLS

E.G. Kuzmina, T.Yu. Mushkarina, T.V. Konstantinova

Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, e-mail: kuzmina_e_g@mail.ru

Summary. The identified hierarchy component of immunity that develops during fibrosis: T cells, memory cells, status activation, initiation of apoptosis of a population of lymphocytes, total T cells and T-helper cells, the ratio of T-helpers and T-killer cells, proliferation of T-lymphocytes; B- and NK-cells; phagocytosis. Correlations reflect the degree of suppression by regulatory T-cells of lymphocyte subpopulations, processes of activation and death of T-lymphocytes, regenerative potential (level of naive lymphocytes and T-cells), increased lymphocyte apoptosis, development and recurrence of inflammatory processes.

Key words: Pulmonary fibrosis, suppressive regulatory T cells, immunity disorders

Актуальность

К побочным эффектам противоопухолевого лучевого или комбинированного лечения онкологического заболевания относят лучевые повреждения, при развитии которых существенно снижается качество жизни пациентов. Многофакторный патогенез лучевых повреждений (величина подведенной дозы, фракций, индивидуальная радиочувствительность, технические недостатки аппаратуры, сопутствующие заболевания и др.) изучен слабо.

Особенно актуально выяснение характера нарушений, развивающихся в ведущих функциональных системах организма на разных уровнях их организации. Обосновано предположение об участии в формировании лучевых повреждений исходных сдвигов в системе иммунитета, а также нарушений, возникающих после проведения комбинированной терапии. Известно, что в поддержании стабильности иммунных реакций особую функцию выполняют регуляторные Т-клетки. Повышение их количества коррелирует с развитием опухолевых и инфекционных заболеваний, снижение - с аллергическими и аутоиммунными процессами[1,2, 3].

Цель работы – использовать многофакторный и корреляционный анализ для оценки состояния иммунитета при лучевых пневмофиброзах с учетом вклада Т-регуляторных клеток в проявление иммунных отклонений.

Для достижения этого сформулированы и решены следующие задачи:

1. При пневмофиброзах методом главных компонент иммунокомпетентные клетки распределены по степени и типу их участия в функционировании иммунной системы.
2. Методом корреляционного анализа оценено влияние Т-регуляторных лимфоцитов на другие типы клеток иммунной системы и их функциональную активность.

Материалы и методы

Обследованы 45 пациентов с лучевым пневмофиброзом, развившимся в поздние сроки после комбинированного лечения рака молочной железы, легкого и лимфомы Ходжкина, включающего лучевую компоненту в суммарной очаговой дозе 40-70Гр с разными схемами фракционирования. В периферической крови оценили относительное и абсолютное количество Т-, В-, НК-лимфоцитов; хелперную и киллерную субпопуляцию Т-клеток; активированные лимфоциты и Т-клетки; Т-регуляторные клетки; соотношение наивных и клеток памяти среди лимфоцитов и хелперной субпопуляции, апоптоз лимфоцитов и Т-хелперов (CD3+, CD19+, CD16+56+, CD4+, CD8+, HLA-DR+, CD3+HLA-DR+, CD45+CD4+CD25+CD127-, CD45RA+ CD45RO-, CD45RA-CD45RO+, CD4+CD45RA+CD45RO-, CD4+CD45RA-CD45RO+, CD3+CD95+, CD4+CD95+), пролиферация лимфоцитов, индуцированная ФГА (РБТЛ), иммуноглобулины М, G, А классов сыворотки крови и функция фагоцитов. Статистический многофакторный и корреляционный анализы выполнены в программе «STATISTICA 8.0».

Результаты

Суммарная дисперсия выделенных факторов иммунитета, отражает взаимодействия между всеми типами иммунокомпетентных клеток и составляет 100%. Иерархически по значимости данные располагаются следующим образом. Первая компонента включает абсолютные значения лимфоцитов; Т-клеток и их функциональное состояние (наивные и клеток памяти, Т-регуляторные лимфоциты, клетки, находящиеся в апоптозе). Вторая компонента определяет значимость соотношения Т-хелперных и Т-цитотоксических лимфоцитов и уровень Т-хелперов в апоптозе. Далее определена роль процессов активации Т-клеток. Следующие три фактора последовательно характеризуют клеточную гибель лимфоцитов и фагоцитоз; уровень В-клеток и РБТЛ; роль НК-клеток и их взаимосвязи с активацией и гибелью Т-клеток и фагоцитозом.

Корреляционным анализом Спирмена обнаружена определенная разнонаправленность связей, проявляемых относительным и абсолютным числом Т-регуляторной популяции. Повышение процента Т-регуляторных клеток угнетает реакции Т-клеточного иммунитета, в том числе Т-хелперы, пролиферацию в РБТЛ, снижает соотношение наивных лимфоцитов и клеток памяти. При этом наблюдается уменьшение процента наивных Т-клеток, что сокращает регенеративный потенциал организма, и повышение уровня Т-клеток памяти, увеличивающих объем информации организма по отношению к инфекционным, аллергенным и опухолевым агентам. Повышение уровня Т-клеток, меченных маркером гибели (CD95), отражает повышенный апоптоз Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов, что снижает клеточный и гуморальный типы ответа. Прямые корреляции, связывающие процент Т-регуляторов с процентом цитотоксических Т-лимфоцитов и поздней активацией лимфоцитов и Т-клеток (HLA-DR+CD3+, HLA-DR+) отражают высоту ответа на вирусную, бактериальную инфекцию и компоненты опухолевых антигенов.

Динамика абсолютного количества регуляторных Т-клеток прямо коррелирует с числом общих Т-клеток, Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов, что, возможно, отражает параллельное накопление разных типов клеток иммунитета и индивидуальную вариабельность. Прямая корреляция между абсолютным числом регуляторных Т-клеток и количеством клеток, экспрессирующих маркеры гибели (Т-хелперы, Т-цитотоксические лимфоциты, общая популяция лимфоцитов) является свидетельством не только их повышенной наработки, как отмечено выше, но и повышенной гибели этих клеточных популяций. Обратная корреляционная зависимость связывает возрастание числа регуляторных Т-клеток со снижением количества активированных, наивных клеток лимфоцитарного пула и процента НК-клеток и отражает широкий диапазон их супрессирующего действия.

Заключение

При развитии пневмофиброза после комбинированного лечения онкологических заболеваний легких, молочной железы и лимфомы Ходжкина выявлена наибольшая значимость и дефектность Т-клеточного звена иммунитета: уровень Т-лимфоцитов, их регенеративный потенциал; память о встрече с инфекционными, аллергенными и опухолевыми агентами (антигенами), активация апоптоза Т-хелперов, значимая роль иммунорегуляторного индекса, отражающего соотношение снижение уровня Т-хелперов к Т-цитотоксическим лимфоцитам и, следовательно, изменение соотношения реакций гуморального и клеточного типа. Последовательно выделена значимость активационного статуса, пролиферации Т-лимфоцитов, инициации апоптоза Т-клеток и общей популяции лимфоцитов, содержания В-клеток и состояния фагоцитоза.

При фиброзе легких повышен уровень регуляторных Т-клеток, осуществляющих супрессию иммунитета, что находит отражение в развитии и рецидивировании воспалительных процессов и формировании пневмофиброза. Корреляционные взаимосвязи регуляторных Т-клеток отражают степень их повышенного супрессирующего действия на субпопуляции лимфоцитов, процессы активации и гибели Т-лимфоцитов, снижение регенеративного потенциала (уровень наивных лимфоцитов и Т-клеток), этапы наработки и повышенной гибели популяции лимфоцитов.

Результаты исследования обосновывают необходимость обновления схем лечения онкологических заболеваний, так и вторичных повреждений легких, возникающих после комбинированной терапии. Оно должно включать внедрение в клиническую практику иммунологических подходов, направленных на элиминацию избыточного количества регуляторных Т-клеток, что приведет к снижению их супрессирующего действия, восстановлению функционального состояния противоинфекционного иммунитета, ослаблению проявлений воспалительных реакций и предотвращению формирования фиброза легких.

«IN VIVO» ДОЗИМЕТРИИ ПРИ АДЬЮВАНТНОЙ БРАХИТЕРАПИИ РАКА ЭНДОМЕТРИЯ.

Кулиева Г.З., Степаненко В.Ф., Богачева В.В., Борышева Н.Б., Дон В.В., Крикунова Л.И.
Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба - филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Обнинск, Россия, e-mail: mrrc@mrrc.obninsk.ru

Резюме. Пациентам с онкогинекологическими заболеваниями проводилась адьювантная брахитерапия на аппарате «Гаммамед» (HDR, ^{192}Ir) с дозиметрическим контролем. Использовались микродозиметры, предварительно помещенные в тканеэквивалентные гибкие трубки миллиметровых размеров, которые размещали в зонах интереса: слизистая влагалища, мочевого пузыря, прямая кишка.

Ключевые слова: брахитерапия, дозиметрия, онкогинекология, дозное распределение, лучевая нагрузка.

"IN VIVO" DOSIMETRY FOR ADJUVANT BRACHYTHERAPY OF ENDOMETRIAL CANCER.

Kulieva G.Z., Stepanenko V.F., Bogacheva V.V., Borysheva N.B., Don V.V., Krikunova L.I.
Medical Radiological Scientific Center. A.F. Tsyba is a branch of the Federal State Budgetary Institution Scientific Medical Research Center for Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, e-mail: mrrc@mrrc.obninsk.ru.

Summary. Adjuvant brachytherapy was performed on patients with gynecological oncological diseases using the Gammamed apparatus (HDR, ^{192}Ir) with dosimetric control. We used microdosimeters previously placed in tissue-equivalent flexible tubes of millimeter sizes, which were placed in areas of interest: vagina, bladder, rectum.

Key words: brachytherapy, dosimetry, gynecological oncology, dose distribution, radiation exposure.

Актуальность: В структуре заболеваемости женского населения России рак тела матки находится на 4 месте, удельный вес составляет 7,8% [1].

Приоритет в лечении инвазивного рака эндометрия сохраняется за комбинированным методом лечения 62,2%, хирургическое лечение получают 33,2% больных, гормональную терапию - 0,4% больных. [2,3]. Адьювантная брахитерапия является компонентом в комбинированных программах лечения больных раком эндометрия, требуя совершенствования технологий лучевой терапии и формирования индивидуальных программ облучения с учетом факторов риска.

Преимуществом брахитерапии является подведение высоких доз к ограниченному объему с наименьшей лучевой нагрузкой на здоровые ткани и критические органы. Поэтому вопросы оптимального пространственно-временного дозного распределения в мишени и органах риска несомненно актуальны. Применения «ин виво» дозиметрии является частью программы обеспечения качества лучевой терапии [4,5] с обеспечением радиационной безопасности и снижением риска лучевых осложнений [6].

Цель исследования: Анализ пространственного распределения планируемых и измеренных доз у пациентов с применением метода внутрисполостной «ин виво»

дозиметрии тканеэквивалентными порошкообразными люминесцентными дозиметрами (LiF) при высокомогностной брахитерапии в онкогинекологии.

Материал и методы. С июня 2018 года пациентам с онкогинекологическими заболеваниями проводилась «ин виво» дозиметрия при брахитерапии на аппарате «Гаммамед» (HDR, ^{192}Ir). В качестве дозиметров используются не инвазивные гибкие тканеэквивалентные сборки порошкообразных люминесцентных микродозиметров LiF (размеры каждого микродозиметра около 100 мкм), разработанные в лаборатории медико-экологической дозиметрии и радиационной безопасности под руководством зав. отделением д.м.н., проф. Степаненко В.Ф.

Сборки микродозиметров размещали с помощью медицинских катетеров в зонах интереса: слизистая влагалища, мочевого пузыря, прямая кишка. Для определения доз на слизистой влагалища дозиметры фиксировались вблизи цилиндрического эндоста, в мочевой пузырь катетер с дозиметрами вводился через уретру, в ректальную область катетер вводился в просвет прямой кишки. Введение медицинских катетеров с детекторами не мешало проведению сеанса облучения. Измерения радиационно обусловленных сигналов в микродозиметрах проводили методом термостимулированной люминесценции. Ранее аналогичная технология была успешно реализована в МРНЦ им. А.Ф. Цыба при брахитерапии рака предстательной железы [7].

Результаты. Сравнение данных «ин виво» дозиметрии при высокомогностной брахитерапии онкогинекологических заболеваний с расчетными (планируемыми) дозами показывает, что в вагине измеренные дозы хорошо согласуются с расчетными. Однако измеренные дозы в мочевом пузыре и в ректальной области превышают расчетные.

Вывод. В клинических условиях апробирована технология внутриволостной автономной «ин виво» дозиметрии с применением автономных микродозиметров в виде микрокристаллов LiF при высокомогностной брахитерапии (HDR, ^{192}Ir) в онкогинекологии.

Список литературы

1. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). – Москва, 2018 г. – с.10
2. Л.И. Крикунова. Лучевая терапия рака тела матки // Практическая онкология - 2004. – Т.43, №5. – С. 33 – 40.
3. И. И. Курганова, В. А. Титова, Ю. М. Крейна // Лучевая терапия в комбинированном лечении больных раком эндометрия с факторами неблагоприятного прогноза // Российский онкологический журнал. – 2008. – № 6. – С. 42 – 49.
4. WHO. Radiotherapy Risk Profile WHO/IER/PSP/2008.12. Geneva: WHO, 2008. 51 p. Available at:
5. IAEA. Lessons learned from accidental exposures in radiotherapy. IAEA Safety Report Series 17. Vienna, IAEA, 2000. 96 p. Available at: http://www-pub.iaea.org/mtcd/publications/pdf/pub1084_web.pdf (Accessed 19 April 2017).
6. Valentin J. Prevention of high-dose-rate brachytherapy accidents. ICRP Publication 97 // Annals of the ICRP. 2005. V. 35, N 2. P. 1-51.
7. Степаненко В.Ф., Бирюков В.А., Каприн А.Д.1, Галкин В.Н., Иванов С.А., Карякин О.Б., Мардынский Ю.С., Гулидов И.А., Колыженков Т.В., Иванников А.И., Борышева Н.Б., Скворцов В.Г., Ахмедова У.А., Богачева В.В., Петухов А.Д., Яськова Е.К., Хайлов А.М., Лепилина О.Г., Санин Д.Б., Коротков В.А., Обухов А.А., Анохин Ю.Н. // Внутриволостная автономная «ин виво» дозиметрия при высокомогностной брахитерапии рака предстательной железы с применением ^{192}Ir : разработка технологии и первые результаты // Радиация и риск. – 2017. - №2. – С. 72-82

**ПРИМЕНЕНИЕ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЖИРОВОЙ
ТКАНИ И ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ КОНДИЦИОННОЙ СРЕДЫ,
ПОЛУЧЕННОЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ЗАЖИВЛЕНИЯ ЛУЧЕВЫХ ЯЗВ
КОЖИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*В.Г. Лебедев¹, Ю.Б. Дешевой¹, А.А. Темнов^{1,2}, Т.А. Насонова¹, А.В. Лырщикова¹,
О.А. Добрынина¹, Т.А. Астрелина¹, Б.Б. Мороз¹*

¹ ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации –
Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА
России, г. Москва, e-mail: vgleb468@yandex.ru, ² ФГАОУВО Московский физико-
технический институт, Московская область, г. Долгопрудный

Резюме. Исследовали влияние трансплантации стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани и введения паракринных факторов (ПФ) кондиционной среды, полученной при культивировании мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), на заживление лучевых язв кожи в эксперименте на крысах инбредной линии Wistar-Kyoto, подвергнутых локальному воздействию рентгеновского излучения в дозе 110 Гр. Показано, что трансплантация СВФ и введение ПФ приводили к стимуляции восстановления кожи, причем при сочетанном применении факторов кондиционной среды и трансплантации клеток эффективность терапии радиационных язв возрастала.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, стромально-васкулярная фракция, жировая ткань, паракринные факторы, рентгеновское излучение, клеточная терапия, лучевые язвы кожи.

**APPLICATION OF ADIPOSE-DERIVED STROMAL VASCULAR
FRACTION CELLS AND PARACRINE FACTORS OF CONDITIONING MEDIUM,
OBTAINED DURING THE CULTIVATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS,
FOR STIMULATING THE HEALING OF RADIATION ULCERS OF SKIN IN
EXPERIMENT**

*V.G. Lebedev¹, Y.B. Deshevoy¹, A.A. Temnov^{1,2}, T.A. Nasonova¹, A.V. Lirschikova¹,
O.A. Dobrynina¹, T.A. Astrelina¹, B.B. Moroz¹*

¹ A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Moscow, Russia,
e-mail: vgleb468@yandex.ru, ² Moscow Institute of Physics and Technology, g.
Dolgoprudnyy.

Summary. The effect of transplantation of stromal vascular fraction (SVF) of adipose tissue and the introduction of paracrine factors (PF) of the conditioned medium, obtained by cultivating mesenchymal stem cells (MMSC), on the healing of radiation ulcers of the skin in experiments on Wistar-Kyoto inbred rats subjected to local effect of X-rays radiation in dose 110 Gy was investigated. It was shown that the SVF transplantation and the introduction of PF stimulated the recovery of the skin, and moreover, with the combined introduction of conditioned medium factors and cells transplantation, the effectiveness of therapy radiation ulcer increased.

Key words: multipotent mesenchymal stem cells, stromal vascular fraction, adipose tissue, paracrine factors, x-rays, cell therapy, radiation skin ulcers.

При лечении опухолей с применением ионизирующего излучения могут возникать местные лучевые поражения, которые характеризуются развитием длительно незаживающих хронических язв на фоне нарушения трофики облученной ткани. Лечение хронических радиационных язв с применением обычных консервативных

методов является очень сложной задачей, и может сопровождаться некрозом и фиброзом тканей. Кроме того, радиационные язвы часто инфицированы, что может приводить к сепсису [1,2]. Перспективным способом лечения местных лучевых поражений является применение клеточной терапии с использованием мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), выделенных из костного мозга или жировой ткани, причем жировая ткань является предпочтительным источником стволовых клеток [3,4]. Стволовые клетки жировой ткани могут применяться как в виде культивированных ММСК, так и в виде стромально-васкулярной фракции (СВФ) [5,6]. Высокая концентрация ММСК в гетерогенной популяции СВФ позволяет получать необходимое количество стволовых клеток без наработки их в культуре. Считается, что благоприятный эффект клеточной терапии при различных видах патологических процессов связан с трофическим действием продуцируемых ферментов, цитокинов и ростовых факторов, необходимых для регенерации тканей [7]. Возможно, что клеточная терапия тяжелых местных лучевых поражений в условиях комбинированного применения стволовых клеток жировой ткани и паракринных факторов, выделенных при культивировании ММСК, может усилить эффекты восстановления пораженной ткани и ускорить заживление радиационных язв.

Цель исследования: изучение влияния трансплантации стромально-васкулярной фракции жировой ткани и паракринных факторов кондиционной среды на течение тяжелых местных радиационных поражений в эксперименте.

Крыс инбредной линии Wistar-Kyoto подвергали локальному воздействию рентгеновского излучения в подвздошно-поясничной области спины на установке ЛНК-268 (РАП 100 – 10) в дозе 110 Гр при мощности дозы 20,0 Гр/мин, напряжении 30 кВ, силе тока 6,1 мА, фильтр 0,1 мм Al, площадь поля облучения на поверхности кожи составляла 8,5 см². Жировую ткань для получения СВФ брали из брюшной и паховой области у интактных крыс, которые не использовались в дальнейшем. Выделение СВФ проводили путем ферментативной обработки размельченной жировой ткани в 0,015 % растворе коллагеназы IA для растворения коллагеновых волокон и освобождения клеток. После центрифугирования и отмывки от фермента получали очищенную СВФ. Суспензию клеток СВФ в 1 мл стерильного раствора Хенкса вводили двукратно в дозах $3,2 \times 10^6$ и $2,8 \times 10^6$ на 28-е и на 35-е сутки после облучения, соответственно, под кожу в 5 точек (по 0,2 мл на точку) вокруг лучевой язвы, отступив 5 мм от края. Паракринные факторы кондиционной среды вводили пятикратно с 1-х по 10-е сутки после облучения, подкожно по 1,0 мл (общий белок 8 мг/мл). Оптимальные сроки и дозы введения СВФ и паракринных факторов были выбраны на основании ранее проведенных экспериментов. После облучения проводили наблюдение за процессом развития местного лучевого поражения и эффективностью терапии. Анализировали динамику изменения площади радиационных язв и тяжести поражения у животных опытных групп по сравнению с облученным контролем. Площадь язв определяли с помощью планиметрии, которую проводили еженедельно, начиная с 14-х суток после облучения, в течение 5 месяцев. Тяжесть течения лучевого поражения кожи оценивали в динамике по клиническим проявлениям, с использованием бальной шкалы оценок. Установлено, что радиационное воздействие при данных параметрах вызывало тяжелые лучевые поражения кожи с длительно незаживающими язвами. В начальный период после воздействия радиации клиническая картина поражения кожи у всех животных была сходна. Так, на 8-11-е сутки после локального облучения отмечались проявления сухого дерматита, а к 14-16-м суткам появлялась экссудация, и сухой дерматит переходил во влажный. Во всех группах к 21-25-м суткам на коже крыс образовывались глубокие лучевые язвы, покрытые плотным струпом темно-коричневого цвета. Далее в

в контрольной группе животных наблюдалось очень медленное заживление с волнообразным течением патологического процесса. Площадь лучевых язв у крыс контрольной группы в период с 26-х до 83-х суток после облучения снижалась в пределах от $2,76 \pm 0,12 \text{ см}^2$ до $1,85 \pm 0,13 \text{ см}^2$, соответственно. У 50 % животных контрольной группы язвы сохранялись более 4 месяцев после облучения, и средняя площадь радиационных язв на 118-125-е сутки после облучения составляла от $0,32 \pm 0,09 \text{ см}^2$ до $0,16 \pm 0,06 \text{ см}^2$, соответственно. В опытной группе при трансплантации СВФ отмечалось более интенсивное заживление, и наблюдалось более выраженное уменьшение площади лучевых язв, статистически значимое уменьшение площади язв отмечалось на 104-125-е сутки ($p < 0,05$) после облучения. В группе крыс с введением ПФ статистически значимое уменьшение площади лучевых язв ($p < 0,05$) по сравнению с контролем отмечалось на 83-е сутки. По динамике тяжести клинических проявлений лучевого поражения, выраженной в баллах, животные опытных групп отличались от контрольной группы более легким течением. Начиная с 76-х суток после облучения, различия тяжести поражения в контрольной и опытных группах были статистически значимыми ($p < 0,05$). К 118-м суткам после облучения в контрольной группе лучевые язвы заживали у 25 % крыс, в то время как в опытных группах, при изолированном применении СВФ и ПФ, полная эпителизация ран с образованием атрофического рубца наблюдалась у 40-55 % крыс. В условиях комбинированного применения СВФ и ПФ кондиционной среды количество животных с полным заживлением радиационных язв составляло 85-100%, что статистически значимо отличалось от контрольной группы.

Таким образом, трансплантация СВФ жировой ткани, а также введение паракринных факторов кондиционной среды могут в сопоставимой степени усиливать регенерационные процессы и стимулировать восстановление кожи, способствуя более раннему заживлению хронических лучевых язв при тяжелых местных лучевых поражениях в эксперименте. При сочетанном введении факторов кондиционной среды и трансплантации стволовых клеток эффективность заживления радиационных язв возрастает. По-видимому, клеточная терапия тяжелых местных лучевых поражений в условиях комбинированного применения стволовых клеток жировой ткани и паракринных факторов, выделенных при культивировании стволовых клеток, может усилить стимулирующие эффекты на восстановление пораженных тканей и ускорить заживление радиационных язв.

Список литературы

1. Радиационная медицина. Руководство для врачей-исследователей и организаторов здравоохранения. Под ред. Л.А. Ильина. – М.: ИздАТ. 2001. Т. 2. 432 с.
2. Singh M., Alavi A., Wong R., Akita S. Radiodermatitis: a review of our current understanding. // *Am. J. Clin. Dermat.* 2016. V.17. P. 277–292.
3. Marfia G., Navone S.E., Di Vito C. et al. Mesenchymal stem cells: potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds. // *Organogenesis*. 2015. Vol.11. №4. P. 183–206. Published online 2015 Dec 10. doi: 10.1080/15476278.2015.1126018.
4. Akita S. Treatment of radiation injury. // *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. 2014. Vol. 3. №1. P. 1–11.
5. Zuk P., Zhu M., Muzuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue implication for cell-based therapeutics. // *Tissue Eng*. 2001. Vol.7. №2. P.211–218.
6. Feisst V., Meidinger S. and Locke M.B. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. // *Stem Cells Cloning*. 2015. Vol. 8. P. 149–162.
7. Nguyen A., Guo J., Banyard D.A. et al. Stromal vascular fraction: a regenerative reality? Part 1: current concepts and review of the literature. // *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg*. 2016. Vol. 69. P.170–179. doi: 10.1016/j.bjps.2015.10.015.

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ ПРОТОНАМИ НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ МЫШЕЙ

К.Н. Ляхова¹, Д.М. Утина^{1,2}, И.А. Колесникова^{1,2}, Ю.С. Северюхин^{1,2}, М.
Лалковичова^{1,3}

¹Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, ²Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Университет «Дубна», г. Дубна, Россия, ³ Институт экспериментальной физики САН, Кошице, Словакия, e-mail: lyakhovakn@mail.ru

Резюме. Проведен анализ зависимостей доза–время–эффект локомоторной активности мышей после облучения ускоренными протонами. Эксперименты проведены на самках аутбредных мышей ICR (CD-1), SPF-категории. Животных облучали в пике Брэгга протонами с начальной энергией 170 МэВ при толщине дополнительного замедлителя 190 мм. Дозы облучения на входе составляли 0,5; 1; 2,5 и 5 Гр. Установлено, что на 8 сутки после облучения мышей в нелетальных дозах (0,5-5,0 Гр) происходит дозозависимое снижение основных показателей спонтанной двигательной активности животных. К 90 суткам после облучения отмечается тенденция увеличения показателей ОИР и ЭС во всех группах облученных животных.

Ключевые слова: мыши, протоны, открытое поле, локомоторная активность, ориентировочно-исследовательская активность, эмоциональный статус

EFFECTS OF RADIATION BY PROTONS ON BEHAVIORAL REACTIONS OF MICE

K.N. Lyakhova¹, D.M. Utina^{1,2}, I.A. Kolesnikova^{1,2}, Yu.S. Severyukhin^{1,2}, M.
Lalkovičova^{1,3}

¹ Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, ² Dubna State University, ³ Slovak Academy of Sciences, Institute of Experimental Physics, Košice, Slovakia, e-mail: lyakhovakn@mail.ru

Summary. The analysis of dependences dose-time-effect of locomotor activity of mice after proton radiation is performed. Experiments were performed on outbred adult female ICR mice (CD-1), SPF categories. The animals were irradiated with protons in a Bragg peak with an energy of 170 MeV on the medical beam of the phasotron of the Joint Institute for Nuclear Research (Dubna). Exposure doses is 0.5, 1, 2.5 and 5 Gy. On the 8th day after proton irradiation of mice in non-lethal doses (0.5-5.0 Gy), there is a dose-independent decrease in the main indicators of the spontaneous locomotor activity of rodents. By the 90th day after irradiation, there is a clear tendency to normalize the indicators of orienting response in all groups of irradiated animals, while the emotional status remains elevated.

Key words: mice, protons, open field, locomotor activity, orienting response, emotional status

В настоящее время широкое применение источников ионизирующей радиации в различных сферах деятельности человека повышает вероятность поражения людей факторами радиационной природы как при авариях и инцидентах на объектах ядерной энергетики, так и в условиях повседневной жизни [1]. Потенциальную угрозу для человека представляет не только источники ядерной энергетики, но и медицинские источники ионизирующего излучения. Становятся более разнообразными условия воздействия на человека и формирующиеся при этом формы лучевого поражения [2]. Действие ионизирующего излучения (ИИ) на центральную нервную систему (ЦНС) вызывает комплекс сложных биохимических и морфофизиологических реакций. Изучение биологических эффектов воздействия ИИ на организм в различные периоды

после облучения является важным направлением для решения задач радиобиологии. Анализ и прогнозирование постлучевых поражений ЦНС является особо актуальным при применении протонной терапии, которая стала особо популярной для лечения онкологических заболеваний в различных отделах мозга пациентов.

Цель работы: Исследование зависимостей доза-время-эффект локомоторной активности мышей после облучения ускоренными протонами в нелетальных дозах.

Материалы и методы:

Животные. Исследования проводили на 60 аутбредных половозрелых самках мышей ICR (CD-1), SPF категории, с исходной массой тела 30-35 грамм, в возрасте 10 недель.

Облучение. Животные были подвергнуты облучению ускоренными протонами на медицинском пучке фазотрона Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна). Мышей помещали в индивидуальные контейнеры, затем группировали по 4 контейнера и размещали на пути протонного пучка. Облучение животных проводили в пике Брэгга в дозах 0,5; 1; 2,5 и 5 Гр по 4 животных одновременно. Использование дополнительного замедлителя, толщиной 190 мм, позволяло снизить энергию протонов с 170 до 70 МэВ.

Оценка поведенческих реакций облученных животных. Оценка проводилась по уровню локомоторной активности в тестовой установке «Открытом поле» (ОП) [3, 4] с круговой серой ареной диаметром 63 см. В течение 3 минут учитывали акты пересечения секторов, проходы через центр, вертикальные стойки, норковый рефлекс. Сумма этих актов составила показатель ориентировочно-исследовательской реакции (ОИР), а акты груминг, замирание, движение на месте – показатель эмоционального статуса (ЭС). Также оценивали отношение показателей ОИР/ЭС. Влияние облучения протонами на поведенческие реакции у мышей проводили на 8, 30 и 90 сутки после облучения.

Для статистической обработки подсчета средней арифметической и ошибки средней использовали программный комплекс *Origin Pro 2015*, достоверность рассчитывали с помощью критерия Манна – Уитни. Результаты принимали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Все эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и «Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных» Советом международных медицинских научных организаций (CIOMS), Женева, 1995 г.

Результаты и обсуждение

Облучение ускоренными протонами оказало статистически значимое влияние на изученные показатели, однако этот эффект имел сложную зависимость и не укладывался в прямую зависимость «доза – эффект». Облучение протонами в дозах 0,5 и 1 Гр вызвало статистически значимое снижение показателей ОИР на 8 сутки после облучения относительно контроля. Было отмечено статистически значимое снижение ОИР на 30 сутки после облучения у животных, облученных в дозах 1; 2,5 и 5 Гр относительно контрольной группы. На 90 сутки после облучения снижение ОИР не было отмечено ни в одной группе облученных животных.

На 90 сутки после облучения наблюдалось ярко выраженное статистически значимое увеличение показателя ЭС у облученных мышей в дозе 0,5 Гр относительно контрольной группы. Далее с увеличением доз происходило небольшое снижение показателя у животных, облученных в дозе 1 Гр и сохранение его на приблизительно таком же уровне при дозах 2,5 и 5 Гр. Статистически значимых различий между группами облученных животных в дозах 1; 2,5 и 5 Гр на 90 сутки отмечено не было.

На 8 сутки происходило статистически значимое уменьшение количества пройденных секторов у животных, облученных в дозе 0,5 Гр относительно контрольной группы. При увеличении доз облучения до 1; 2,5 и 5 Гр этот показатель статистически значимо не изменялся относительно группы животных, облученных в дозе 0,5 Гр. Аналогичная картина наблюдалась на 8 сутки после облучения и при анализе количества вертикальных стоек у группы облученных животных. На 30 сутки после облучения наблюдалась обратная зависимость. При увеличении доз с 0,5 до 2,5 Гр происходило статистически значимое снижение количества пройденных секторов. Однако в дозе 5 Гр уже не наблюдается такой обратной зависимости и происходило увеличение этого показателя.

В ходе эксперимента на мышах начиная с 8 и 30 суток, происходило снижение таких показателей как: «сектора», «выход в центр» и «вертикальные стойки» как у облученных, так и у контрольной группы животных. Показатель «норки» снизился только у облученных животных после выраженной стимуляции на 8 сутки после облучения. Показатели дозовой зависимости имеют сложный, в большинстве случаев непропорциональный характер. Так на 8 сутки после облучения во всех группах облученных животных отмечено снижение показателей «сектора», «вертикальные стойки», «ОИР» и отношения «ОИР/ЭС», напротив показатель «норки» оказался статистически значимо увеличен. Интегральный показатель: отношение ОИР/ЭС на 90е сутки после облучения продемонстрировал отчетливую обратную дозовую зависимость, что указывает на сложные взаимоотношения процессов возбуждения и торможения в ЦНС облученных животных. Группа животных облученных в дозе 5,0 Гр во все сроки наблюдения продемонстрировала наибольшую активность по показателям, относящихся к ОИР и наименьшую по показателю ЭС.

Выводы:

1. На 8 сутки после протонного облучения мышей в нелетальных дозах (0,5-5,0 Гр) происходит дозозависимое снижение основных показателей спонтанной двигательной активности животных.

2. К 90 суткам после облучения отмечается тенденция увеличения показателей ОИР и ЭС во всех группах облученных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Аветисов Г.М., Гончаров С.Ф. Медицинские и санитарно-гигиенические проблемы ликвидации последствий радиационных аварий/ Медицина катастроф. медицины/ Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2008. №3 (23). Приложение 1. С. 176.

2. Турай И. Уроки, которые следует извлечь из медицинской помощи, оказанной при недавних радиационных авариях/ Мед. радиол. и радиацион. безопасность. 2006. Т. 51. № 5. С. 80–82.

3. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. Методики и основные экс-перименты по изучению мозга и поведения. М.: Наука, 1992 г. С. 159-245;

4. Hall C. S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity //Journal of Comparative Psychology. 1936. Т. 22. №. 3. P. 345.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РАДИОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

*Е.В. Мурзина*¹, *Г.А. Софронов*^{1,2}, *А.С. Симбирцев*^{2,3}, *Н.В. Аксенова*¹, *О.М. Веселова*¹
¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», ² ФГБНУ
«Институт экспериментальной медицины», ³ ФГУП «ГосНИИ особо чистых
биопрепаратов», Санкт-Петербург, Россия, e-mail: vmeda-nio@mil.ru

Резюме. В экспериментах на белых беспородных мышах изучено протекторное действие от воздействия летальных доз рентгеновского излучения рекомбинантных препаратов – флагеллина, в том числе в комбинации с интерлейкином 1 бета, и бета D-глюкана. Показано, что после внутрибрюшинного введения в дозе 1 мг/кг в короткие сроки до воздействия ионизирующего излучения рекомбинантный флагеллин оказывал выраженный эффект на выживаемость мышей, облученных в диапазоне доз 7,5–8,5 Гр. Одновременное применение флагеллина с интерлейкином 1 бета обеспечивало 100% выживаемость мышей при летальности в контрольной группе 53% ($p < 0,01$). Противолучевой эффект бета D-глюкана был выявлен после его перорального применения в дозе 500 мг/кг через 1 ч после облучения животных. Результаты свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших исследований эффективности рекомбинантных препаратов в целях разработки новых противолучевых средств.

Ключевые слова: рентгеновское излучение, флагеллин, интерлейкин 1 бета, бета D-глюкан, облучение, выживаемость

*E.V. Murzina*¹, *G.A. Sofronov*^{1,2}, *A.S. Simbirtsev*^{2,3}, *N.V. Aksenova*¹, *O.M. Veselova*¹
¹ S.M. Kirov Military Medical Academy, ² Institute of Experimental Medicine, ³ Research
Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia

Summary.

In experiments on mice, the protective effect of lethal X-ray doses of recombinant drugs flagellin, including in combination with interleukin 1 beta, and beta D-glucan, was studied. It is shown that after intraperitoneal administration at a dose of 1 mg/kg in a short time before exposure to ionizing radiation, recombinant flagellin had a pronounced effect on the survival of mice irradiated in the dose range of 7.5–8.5 Gy. Simultaneous use of flagellin with interleukin 1 beta provided 100% survival of mice with mortality in the control group 53% ($p < 0,01$). The radioprotective effect of beta D-glucan was detected after oral administration at a dose of 500 mg/kg 1 h after irradiation. The results indicate the prospects for further studies of the effectiveness of recombinant drugs for the development of new radioprotective agents.

Key words: X-radiation, flagellin, interleukin-1 beta, beta D-glucan, irradiation, survival rate

Серьезным ограничением применения практически всех известных противолучевых средств, позволяющих снизить побочные эффекты противоопухолевой радиотерапии и/или обеспечить защиту нормальных тканей, попадающих в зону лучевого воздействия, является низкое соотношение эффективности и переносимости. Так, радиопротектор амифостин, одобренный FDA для медицинского применения в США и странах Западной Европы для снижения поражения нормальных тканей при радиотерапии опухолей головы и шеи, эффективен в дозах, приближающихся к максимально переносимым [1].

В целях повышения радиорезистентности организма и ускорения репарации постлучевых повреждений возрастает интерес к соединениям природного происхождения, распознающихся рецепторами иммунных клеток млекопитающих с последующим запуском иммунного ответа [2]. Современный уровень развития молекулярной биотехнологии с использованием генетических подходов открывает новые перспективы в создании разных классов фармакологических препаратов, в том числе средств с противолучевой активностью. Преимуществами биотехнологических молекул является их стабильность, относительно невысокая стоимость производства, возможность достаточно быстрой наработки и создания удобной для применения лекарственной формы.

Цель исследования: исследование противолучевого действия препаратов (рецептур) на основе биотехнологических молекул как кандидатов для конструирования фармакологических средств защиты организма от воздействия ионизирующего излучения.

Материалы и методы исследования. Были использованы генно-инженерные препараты – флагеллин бактерий *Salmonella typhimurium* (рФЛ) и Беталейкин (коммерческое название интерлейкина-1бета человека, ИЛ-1 β), синтезированные в Государственном НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России (Санкт-Петербург), и бета D-глюкан *Saccharomyces cerevisiae* (β -ГЛ), синтезированный в Санкт-Петербургском государственном технологическом институте (технологическом университете).

Оценку противолучевой эффективности препаратов проводили в экспериментах на половозрелых беспородных белых мышах-самцах массой тела 20-25 г, содержащихся в условиях вивария с соблюдением Правил для проведения работ с использованием экспериментальных животных. Животных подвергали однократному общему относительно равномерному рентгеновскому облучению с использованием рентгенотерапевтической установки «РУМ-17» при напряжении 180 кВ, силе тока 14 мА, фильтре 0,5 мм Cu + 1 мм Al с мощностью дозы 38,4 Р/мин в направлении «спина – грудь». Выживаемость облученных животных анализировали по методу Каплана-Мейера. Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью пакета прикладных программ Statistica 8,0.

Результаты исследования и их обсуждение. Изучение противолучевой активности рФЛ после внутрибрюшинного введения в разных схемах показало, что препарат оказывал выраженное протекторное влияние на выживаемость облученных мышей в условиях его профилактического применения в короткие сроки до острого рентгеновского воздействия.

30-суточная выживаемость животных, облученных в дозе 7,5 Гр составила 77%, в дозе 8,5 Гр – 80%, различия были статистически значимы в сравнении с контрольными группами, летальность в которых составила, соответственно, 31% ($p < 0,05$) и 100% ($p < 0,01$). Данный эффект носил дозозависимый характер: профилактическое применение рФЛ в дозе 2,0 мг/кг при облучении мышей в дозе 8,0 Гр доля способствовало повышению доли выживших мышей до 87% (на 67% по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$), в дозе 1,0 мг/кг увеличивало выживаемость на 33%, в дозе 0,5 мг/кг – на 20%. Применение рФЛ в короткие сроки после радиационного воздействия также приводило к снижению летальности подопытных животных, но менее значимо. Влияния на продолжительность жизни погибших от облучения животных при применении рФЛ отмечено не было.

В последние годы считается перспективным подход, направленный на комплексное применение радиозащитных средств, обладающих разными механизмами действия, что, как предполагается, позволит более эффективно воздействовать на

разные звенья патогенеза лучевых повреждений. Учитывая это, было изучено влияние на параметры выживаемости облученных мышей комбинированного применения рФЛ с ИЛ-1 β , противолучевые свойства обобщены в монографии [3]. Использование рФЛ и ИЛ-1 β в комбинации значимо повышало выживаемость облученных в дозе 7,5 Гр мышей во всех изученных схемах, но наиболее эффективно при профилактическом введении препаратов одновременно за 15-30 мин до облучения, которое обеспечивало 100%-ную выживаемость облученных животных (выживаемость в контрольной группе составила 53%, $p=0,003$).

Для оценки противолучевых свойств препарат β -ГЛ вводили животным *per os* в форме водного раствора в дозах 50, 250 и 500 мг/кг при облучении мышей в дозе 8,0 Гр ($\pm 15-30$ мин). Установлено, что β -ГЛ в дозе 500 мг/кг при пострadiационном применении обеспечивал защиту облученных мышей на уровне ИЛ-1 β , введенного внутривентриально за 15-30 мин до облучения (50 мкг/кг) – 48% и 50%, соответственно, в то время как без применения препаратов выживаемость составила 20%.

О перспективности в качестве радиозащитных препаратов соединений данных классов свидетельствуют публикации зарубежных авторов. В частности, экспериментально показана способность производного флагеллина энтолимоды (*Cleveland BioLabs*, США) снижать тяжесть лучевой пневмонии, подавлять развитие пневмофиброза и вызванное локальным радиационным воздействием повреждение кожных покровов и слизистых оболочек [4, 5]. Полисахариды β -глюканы – компоненты клеточной стенки бактерий, грибов, дрожжей, водорослей и некоторых растений, воздействуя на разные звенья иммунитета, способны оказывать в организме млекопитающих разнообразные эффекты, в том числе стимуляцию угнетенного радиационным воздействием костномозгового кроветворения [6].

Таким образом, изученные рекомбинантные соединения могут быть рассмотрены в качестве перспективных кандидатных молекул в интересах разработки новых отечественных противолучевых препаратов (рецептур).

Список литературы

1. Johnke R.M., Sattler J.A., Allison R.R. Radioprotective agents for radiation therapy: future trends // *Future oncol.* 2014. Vol. 10, N 15. P. 2345–2357.
2. Liu Z., Lei X., Li X. [et al.] Toll-like receptor and radiation protection // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2018. Vol. 22, N 1. P. 31–39.
3. Гребенюк А.Н., Легеза В.И. Противолучевые свойства интерлейкина-1. СПб: Издательство Фолиант, 2012. 216 с.
4. Wang Z.D., Qiao Y.L., Tian X.F. [et al.] Toll-like receptor 5 agonism protects mice from radiation pneumonitis and pulmonary fibrosis // *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* 2012. Vol. 13, N 9. P. 4763–4767.
5. Toshkov I.A., Gleiberman A.S., Mett V.L. [et al.] Mitigation of radiation-induced epithelial damage by the TLR5 agonist Entolimod in a mouse model of fractionated head and neck irradiation // *Radiat. Res.* 2017. Vol. 187, N 5. P. 570–580.
6. Hofer M., Pospíšil M. Modulation of animal and human hematopoiesis by β -glucans: a review // *Molecules.* 2011. Vol. 16, N 9. P. 7969–7979.

ОЦЕНКА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК (TREG)

Т.Ю. Мушкарина, Т.В. Константинова, Е.Г. Кузьмина, Л.Ю. Гривцова

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Россия, e-mail: jeweltany@gmail.com

Резюме Оценена чувствительность регуляторных Т-клеток (Treg) к гамма-излучению в диапазоне доз 2-8 Гр в условиях *in vitro*. Проанализированы образцы культур лимфоцитов 6 доноров. Оценена динамика уровня Treg-клеток в культуре на 1, 2, 3, 4 и 6 сутки инкубации после облучения. В общем объеме собранных лимфоцитов за период культивирования в зависимости от дозы облучения не выявил статистически значимых изменений процентного и абсолютного количества Treg-клеток ($F_{3/76df} = 0,22$; $p = 0,88$ в обоих случаях).

Ключевые слова: регуляторные Т-клетки (Treg), тесты *in vitro*, гамма-облучение, доноры крови

IN VITRO ESTIMATION OF THE EFFECTS OF GAMMA-IRRADIATION ON REGULATORY T-CELLS (Treg) OF HEALTHY DONORS

T.Yu. Mushkarina, T.V. Konstantinova, E.G. Kuzmina, L.Yu. Grivtsova

Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, e-mail: jeweltany@gmail.com

Summary The sensitivity of regulatory T-cells (Treg) was evaluated to gamma irradiation at the dose range of 2-8 Gy *in vitro*. The analysis of 6 samples of lymphocytes cultures from healthy donors. The incubation of mononuclear cells was carried out for 1, 2, 3, 4 and 6 days after irradiation. During the analysis of the data regarding the content of regulatory T cells in the total quantity of lymphocytes in the cultivation period and with different irradiation dose, no statistically significant dynamics of percentage and absolute amount of that cells were found ($F_{3/76df} = 0.22$; $p = 0.88$ at the both cases).

Key words: regulatory T-cells (Treg), tests *in vitro*, gamma-irradiation, healthy donors.

Актуальность

Исследование механизмов иммунной регуляции, в настоящее время является перспективным направлением современной онкологии. Регуляторные Т-клетки (Treg) - одна из ключевых популяций, участвующая в создании иммуносупрессорного опухолевого микроокружения наряду с M2 макрофагами и супрессорами миелоидного происхождения. Данная субпопуляция оказывает ингибирующее влияние на иммунокомпетентные клетки и содействует опухолевой прогрессии и метастазированию [1, 2]. В литературных источниках имеются немногочисленные противоречивые данные о характере действия, оказываемого ионизирующим излучением на регуляторные Т-клетки. Например, в работе Mengde et al. (2010) в тестах *in vitro* показано, что регуляторные Т-клетки более радиочувствительны к гамма-излучению, чем эффекторные Т-клетки [3]. В то же время в работе Yanan Qu et al. (2010) было обнаружено, что после гамма-облучения мышей линии C57BL/6 в дозе 5Гр популяция регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$) более радиорезистентна, чем $CD4^+CD25^-$ -клетки [4]. В связи с этим изучение чувствительности регуляторных Т-

клеток к облучению является актуальной и приоритетной задачей, позволяющей прояснить механизмы реализации эффектов лучевой терапии.

Цель исследования - изучить чувствительность регуляторных Т-клеток доноров крови к гамма-излучению в тестах *in vitro*.

Материалы и методы

Образцы культур лимфоцитов периферической крови получены у 6 здоровых доноров в возрасте от 19 до 76 лет. Мононуклеары выделены на градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,077$). После выделения мононуклеары облучены на гамма-терапевтическом аппарате дистанционного облучения «Рокус М». Запущено несколько серий тестов с дозами 2, 4, 8 Гр при мощности дозы 1,17 Гр/мин, контролем служили необлученные мононуклеары. Далее и облученные мононуклеары, и клетки группы контроля в исходной концентрации $1,0 \times 10^6$ кл/мл культивировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, гентамицина - 400 мкг/мл, ИЛ-2 (ронколейкина) в концентрации 100 МЕ/мл при 37°C в течение 6 суток. Регуляторные Т-клетки и основные субпопуляции лимфоцитов оценены методом многоцветной проточной цитометрии на приборе FACS Canto II (BD Biosciences). Популяция регуляторных Т-клеток определена по иммунофенотипу $\text{CD45}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^{\text{low/-}}$. Динамику уровня этих клеток оценивали в культуре на 1, 2, 3, 4 и 6 сутки инкубации после облучения. Сравнение средних арифметических значений относительного и абсолютного количества регуляторных Т-клеток в зависимости от дозы облучения проведено с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Статистическая обработка проведена в программе «STATISTICA 8.0».

Результаты

В результате проделанной работы в тестах *in vitro* получены предварительные результаты о реакции регуляторных Т-клеток на гамма-облучение. В течение 6 суток не выявлено статистически значимой динамики процентного и абсолютного количества супрессорных регуляторных Т-лимфоцитов в зависимости от подведенной дозы облучения ($F_{3/76\text{df}} = 0,22$; $p = 0,88$ в обоих случаях) как в опытных группах, так и в сопоставлении с контролем. Средняя величина и стандартное отклонение суммарно по всем группам ($n=80$) для относительного и абсолютного числа регуляторных Т-клеток равнялись $7,5 \pm 3,5\%$ и $0,028 \pm 0,026 \cdot 10^9$ кл/л соответственно.

Следует учитывать неоднородность анализируемого материала. Он представлен совокупностью клеток, полученных за весь период культивирования - 6 суток (1, 2, 3, 4 и 6 сутки культивирования) от разных людей, поэтому помимо дозы, на результатах анализа может проявляться действие времени культивирования и индивидуальные особенности функционирования иммунной системы. Для учета фактора времени подсчитано относительное и абсолютное количество регуляторных Т-клеток в зависимости от срока культивирования клеток. Статистически значимых различий процентного и абсолютного числа регуляторных Т-клеток не выявляется вплоть до 4 суток культивирования (суммарно по 1-4 группам, $n=64$, - $7,8 \pm 2,5\%$ и $0,032 \pm 0,026 \cdot 10^9$ кл/л соответственно). На 6 сутки резко меняется индивидуальный уровень числа регуляторных Т-клеток ($0,009 \pm 0,016 \cdot 10^9$ кл/л). В меньшей степени изменяется их среднее процентное содержание ($6,0 \pm 7,5\%$). Возможно, большие различия и разброс данных получаются из-за резкого падения жизнеспособности клеток на 6-й день культивирования относительно первых-четвертых суток, с 90 до 50%, что, в свою очередь, влияет на интерпретацию данных.

Заключение

Изучена динамика регуляторной популяции Т-лимфоцитов при облучении крови 6 доноров в дозах 2, 4 и 8 Гр при содержании клеток *in vitro* в течение 1, 2, 3, 4 и 6

суток в полной питательной среде 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 100 МЕ/мл ронколейкина (ИЛ-2). При анализе дозовой зависимости процентного и абсолютного количества супрессорных регуляторных Т-лимфоцитов не выявлено их статистически значимой динамики в диапазоне подведенных доз облучения 2-8 Гр. Эти данные, тем не менее, носят предварительный характер, т.к. в изученный период на результаты исследований, помимо облучения, оказывали влияние фактор времени и индивидуальные особенности иммунитета доноров. Необходимо продолжить исследования и набор статистического материала для подтверждения того факта, что регуляторные Т-лимфоциты являются небольшой популяцией радиоустойчивых клеток среди лимфоцитов даже после облучения в достаточно высоких дозах (8 Гр), в то время как другие клетки лимфоидного ряда гибнут при меньших дозах. Для выявления функционирования регуляторных Т-клеток особый научный и практический интерес представляет анализ их взаимосвязи с индивидуальным составом клеточных популяций иммунной системы.

Литература:

1. Beyer M., Schultze J. L. Regulatory T cells in cancer // [Blood](#). 2006. Vol. 108, No. 3. P. 804-811.
2. Tai-You Ha. The Role of Regulatory T Cells in Cancer // *Immune Netw.* 2009. Vol. 9, No. 6. P. 209-235.
3. Mengde Cao, Roniel Cabrera, Yiling Xu et al. Different radiosensitivity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and effector T cells to low dose gamma irradiation in vitro // *Int. J. Radiat. Biol.* 2010. Vol. 87, No. 1. P. 71–80.
4. Yanyan Qu, Shuguang Jin, Aijun Zhang et al. Gamma-Ray Resistance of Regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T Cells in Mice // *Radiation Research.* 2010. Vol. 173, No.2. P. 148–157.

MFISH: ВОЗМОЖНОСТИ И ПРЕИМУЩЕСТВА МЕТОДА ПРИ АНАЛИЗЕ ХРОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗЛУЧЕНИЕМ РАЗНОГО КАЧЕСТВА

Насонова Е.А.

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия, e-mail: nasonova@jinr.ru

Резюме. 24-цветный FISH анализ метафаз лимфоцитов ПКЧ здорового донора, облученных γ -квантами Co^{60} , протонами 150 МэВ и в расширенном пике Брэгга, используемом для облучения опухолей в Медико-техническом комплексе Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ, а также ускоренными ионами азота в дозе 1 Гр (ЛПЭ 71 кэВ/мкм) выявил бóльшую эффективность корпускулярных излучений по индукции комплексных ХА (3 и более разрывов в 2 и более хромосомах) по сравнению с фотонным излучением, а также бóльшую сложность этих комплексов. ОДЭ протонов по этим показателям значительно превышает 1, которая ранее была получена стандартным метафазным анализом.

Ключевые слова: хромосомные aberrации, mFISH, протоны, плотноионизирующее излучение, ОДЭ, комплексные aberrации

MFISH: CAPACITIES AND ADVANTAGES OF THE METHOD IN ANALYSIS OF CHROMOSOME ABERRATIONS INDUCED BY RADIATION OF DIFFERENT QUALITY

Nasonova E.A.

Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia, e-mail: nasonova@jinr.ru

Summary. 24-color FISH analysis of metaphases of healthy donor's periphery blood lymphocytes exposed to γ - Co^{60} , 150 MeV and spread out Bragg peak protons used for cancer treatment at Medical technical complex of Dzhelepov Laboratory of Nuclear Problems (JINR, Dubna) and to accelerated nitrogen ions at a dose 1 Gy (LET 71 keV/ μ) has shown the higher efficiency of particle beams in induction and complexity of complex aberrations as compared with photon irradiation. The relative dose effect of protons for these indices significantly exceeds 1 which was previously obtained using standard metaphase assay.

Key words: chromosome aberrations, mFISH, protons, high-LET radiation, RDE, complex aberrations

Хромосомные aberrации (ХА), представляющие собой финальный результат повреждения и репарации ДНК, являются маркером генотоксического воздействия, в частности, радиационного. До настоящего времени оценка частоты хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови является, по сути, единственным реальным методом биодозиметрии человека, позволяющим оценить поглощенную дозу радиации [1]. Современный и актуальный метод multicolor (multiplex) Fluorescent In Situ Hybridization (mFISH), внедренный в ЛРБ ОИЯИ в 2018 году, позволяет идентифицировать каждую пару хромосом клеток человека (22, X, Y), мышей (20, X, Y), крыс и т.д. путем гибридизации ДНК хромосом с пробами, мечеными уникальными сочетаниями 5 флуорохромов. Комбинации флуорохромов интерпретируются программой анализа (пробы и программное обеспечение компании MetaSystems, Германия). Aberrации, выявляемые на mFISH-окрашенных препаратах, классифицировали по системе mPAINT [2] и подразделяли на фрагменты (хромосомные и хроматидные) – результат 1 двунитевого разрыва (ДР) ДНК; простые обмены, включающие дицентрики, транслокации, кольца и хроматидные обмены, -

результат 2 ДР в двух хромосомах, и, самое главное, комплексные aberrации (3 и более разрывов в 2 и более хромосомах). Комплексная aberrация описывается формулой C/A/B (Chromosomes/Arms/Breaks): сколько хромосом, плеч хромосом и разрывов входят в ее состав. С началом применения метода FISH стало ясно, что большое число aberrаций, которые раньше считали простыми, являются частью комплекса, включающего разрывы в нескольких хромосомах и взаимодействие их между собой. Это приводит к необходимости переоценки многих постулатов классической цитогенетики. Например, ранее показано и нами подтверждено в настоящей работе, что знаменитая линейно-квадратичная зависимость выхода дицентриков от дозы редкоизионизирующего излучения определяется комплексными aberrациями (3 и более разрывов в 2 и более хромосомах), тогда как выход простых дицентриков линейно зависит от дозы.

Многоцветный FISH анализ успешно используется последние десятилетия для углубленного анализа цитогенетического действия плотноизионизирующих излучений [3], для оценки последствий радиотерапии опухолей, в частности, адронной терапии ионами углерода [4,5] а также для оценки генетической стабильности и радиочувствительности эмбриональных стволовых клеток человека и животных [6].

ОБЭ протонов, широко используемых в радиотерапии опухолей, в частности, в нашем институте, до сих пор остается поводом для дискуссий. В настоящее время используется фиксированное значение 1.1. Однако применение новых прогрессивных методов оценки повреждений, индуцированных излучением, может снизить неопределенности в соотношении ОБЭ-ЛПЭ для протонов. Методом mFISH действие протонов на клетки человека практически не изучено.

Поэтому задачей настоящего исследования стал 24-цветный FISH анализ метафаз лимфоцитов периферической крови здорового донора, облученных γ -квантами Co^{60} (ЛПЭ 0.2 кэВ/мкм) и протонами 150 МэВ (Ре, ЛПЭ 0.5 кэВ/мкм) и в расширенном пике Брэгга, используемом для облучения опухолей в Медико-техническом комплексе Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ (Рр, средняя ЛПЭ 1.4 кэВ/мкм). Ранее пробы анализировали стандартным метафазным методом [7], при котором ОБЭ протонов 150 МэВ (Ре) достоверно не отличалась от единицы. В качестве примера действия плотноизионизирующих излучений приведены данные, полученные при облучении ускоренными ионами азота в дозе 1 Гр (ЛПЭ 71 кэВ/мкм; облучение на циклотроне МС-400 Лаборатории ядерных реакций ОИЯИ).

Количество aberrаций на клетку не отличалось значительно в пробах, облученных γ и Ре в дозе 3 Гр: 1,89 и 2,0, соответственно, и 2,52 – Рр. Спектр aberrаций для всех 3 видов радиации был схож и составлял примерно 20% комплексных aberrаций, 60% простых обменов и 20% фрагментов. После облучения 1 Гр ионов азота, однако, спектр значительно менялся: 42% комплексных aberrаций, 44% простых обменов и 14% фрагментов. В случае mFISH анализа число aberrаций не является удачным показателем из-за наличия комплексных aberrаций. Лучше отражает картину общее число разрывов на клетку, которое подсчитывается как сумма числа фрагментов, удвоенного числа простых обменов плюс сумма всех В комплексных aberrаций из формулы C/A/B. Общее число разрывов на клетку в Ре составило 4,47, что достоверно превышало 3.96 для γ и достигало 6,0 для Рр и 7,6 для 1 Гр N^{14} . При этом общее число разрывов, регистрируемое при рутинном анализе, подсчитанное как сумма числа фрагментов плюс удвоенное число обменов, было на 40-50% ниже.

Поскольку мы пока не имеем кривых доза-эффект для определения ОБЭ протонов, мы вслед за Л. Сабатьер с коллегами [8] использовали термин ОДЭ (относительный дозовый эффект) для сравнения эффектов одинаковых доз. По общему

числу разрывов на клетку ОДЭ составила $1,13 \pm 0,06$ и $1,51 \pm 0,08$ для 3Гр Ре и Рр, соответственно, и $12,7 \pm 1,46$ для 1 Гр N¹⁴.

Количество комплексных aberrаций было выше в Ре по сравнению с γ ; однако, наилучшим показателем была доля разрывов, участвующих в комплексных aberrациях, в общем числе разрывов: 27, 37, 42 и 70% для 3 Гр γ , Ре, Рр и 1 Гр N¹⁴, соответственно. Здесь ОДЭ составила $1,40 \pm 0,16$, $1,58 \pm 0,17$ и $9,68 \pm 4,10$ для 3 Гр Ре и Рр и 1 Гр N¹⁴.

Важным показателем кластерности повреждений ДНК при облучении частицами является не только количество, но и сложность комплексных aberrаций, которая характеризуется, например, средним числом разрывов на комплекс. Это число очень близко для обоих пучков протонов (4,4 и 4,5) и значительно превышает показатель для γ (3,5): ОДЭ для 3Гр составляет $1,25 \pm 0,11$ и $1,28 \pm 0,11$ для Ре и Рр.

Очевидно, что ОБЭ корпускулярных излучений, особенно плотноионизирующей радиации с высокими ЛПЭ, может быть недооценена при рутинном цитогенетическом анализе тем более, чем больше сложных комплексов она индуцирует.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что mFISH анализ обладает большими возможностями и может и должен быть использован для оценки биологической эффективности излучений разного качества, для мониторинга пациентов, проходящих курсы радиотерапии, для верификации новых терапевтических и диагностических инструментов, использующих радиацию всех видов, а также для тонкой оценки отдаленных последствий радиотерапевтических воздействий.

Список литературы

1. Cytogenetic dosimetry: application in preparedness for and response to radiation emergencies. 2011, IAEA, Vienna.
2. Cornforth MN. Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting. *Radiat Res* 2001;155:643–59.
3. Lee R., Sommer S., Hartel K., Nasonova E., Durante M., Ritter S. Complex exchanges are responsible for the increased effectiveness of C-ions compared to X-rays at the first post-irradiation mitosis. *Mutat. Res.*, 2010, v.701, pp.52-59.
4. Hartel, A. Nikoghosyan, M. Durante, S. Sommer, E. Nasonova, C. Fournier, R. Lee, J. Debus, Schulz-Ertner D., S. Ritter. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of prostate cancer patients treated with IMRT and carbon ions. *Radiotherapy and Oncology*, 2010, v.95 (1): 73-78.
5. Hartel C., Nasonova E., Fuss M.C., Nikoghosyan A., Debus J., Ritter S. Persistence of radiation-induced aberrations in patients after radiotherapy with C-ions and IMRT *Clinical and Translational Radiation Oncology* 13 (2018) 57–63.
6. S. Luft, I. Kulish, E. Nasonova, M. Durante, S. Ritter, I. Schroeder. Ionizing radiation alters human embryonic stem cell properties and differentiation capacity by diminishing the expression of activin receptors. *Stem Cells and Development* · Volume 26, Number 5, 2017 DOI: 10.1089/scd.2016.0277
7. A. Kowalska, E. Nasonova, K. Czernski, P. Kutsalo, W. Pereira, E. Krasavin: “Production and distribution of chromosome aberrations in human lymphocytes by particle beams with different LET” *Radiation and Environmental Biophysics*, 2019, <https://doi.org/10.1007/s00411-018-0771-4>.
8. Shim G., Normil M., Testard I., Hempel W., Ricoul M., Sabatier L. Comparison of individual radiosensitivity to γ -rays and carbon ions. *Frontiers in Oncology*, 2016, v. 6, article 137. DOI: 10.3389/fonc.2016.00137.

GEUM RIVALE L. КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ СОПРОВОЖДЕНИЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

А.А. Орлова¹, М.Н. Пovyдыш¹, А.Н. Гребенюк^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; ²ООО «Специальная и Медицинская Техника», Санкт-Петербург, Россия

e-mail: lanas_95@mail.ru

Резюме. Выполнен метаболомный профайлинг первичных и вторичных метаболитов нефармакопейного вида растительного сырья – трава *Geum rivale L.* (гравилата речного), в результате которого выявлен ряд неописанных ранее соединений. Проведено компьютерное прогнозирование биологической активности данных метаболитов, которое показало высокую вероятность проявления антиоксидантной активности, что позволяет рассматривать *Geum rivale L.* как перспективный источник лекарственных средств для сопровождения лучевой терапии.

Ключевые слова: фитохимический анализ, растительные полифенолы, антиоксидантный эффект, радиомодификатор, лечение, лучевая терапия.

GEUM RIVALE L. AS PERSPECTIVE SOURCE OF MEDICINES FOR SUPPORTING OF RADIATION THERAPY

A.A. Orlova¹, M.N. Povydysh¹, A.N. Grebenyuk^{1,2}

¹ St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia;

²Special & Medical Equipment LLC, St. Petersburg, Russia

e-mail: lanas_95@mail.ru

Metabolic profiling of the primary and secondary metabolites of the non-pharmacopeia type of plant raw materials - grass *Geum rivale L.* was carried out, as a result of which a number of previously undescribed compounds were revealed. Computer prediction of the biological activity of these metabolites was carried out, which showed a high probability of the manifestation of antioxidant activity, which allows us to consider *Geum rivale L.* as a promising source of drugs for the support of radiation therapy.

Keywords: phytochemical analysis, plant polyphenols, antioxidant effect, radiomodifier, treatment, radiation therapy.

Лучевая терапия на сегодняшний день является достаточно эффективным и научно обоснованным методом борьбы со злокачественными новообразованиями различной локализации. Однако терапевтический эффект подобной терапии нивелируется высокой токсичностью по отношению к здоровым тканям организма за счет многократного увеличения количества свободных радикалов и развития оксидативного стресса. Коррекция данных явлений возможна путем решения проблемы радиомодификации, в которой выделяют два альтернативных направления – повышение избирательности воздействия ионизирующего излучения на опухолевые клетки и защита здоровых тканей в зоне облучения [1]. Учитывая важную роль оксидативного стресса в развитии лучевого поражения, весьма перспективным представляется поиск радиомодификаторов среди лекарственных растений и природных соединений, проявляющих антиоксидантную активность, но обладающих при этом низкой токсичностью и хорошей переносимостью [2, 3].

Известно, что растительные полифенолы и полиолы обладают значительным антиоксидантным потенциалом за счет большого количества фенольных и

гидроксильных групп в структуре молекулы. Они способны модулировать влияние свободных радикалов, предотвращая повреждение клеток и тканей организма, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных радиомодификаторов и/или средств сопровождения лучевой терапии злокачественных новообразований [4, 5].

В связи с этим, целью данного исследования явилось комплексное изучение состава первичных и вторичных метаболитов травы гравилата речного и выявление перспективных молекул – потенциальных действующих веществ новых лекарственных средств для сопровождения лучевой терапии.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовались образцы травы *Geum rivale L.*, заготовленные в окрестностях питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (Ленинградская область, Приозерское шоссе, 38 км) в 2018 году. Сырье собрали в период цветения, надземные части растений срезали ножницами на расстоянии 3-5 см от почвы, рыхло укладывали сырье в тканевые мешки и быстро доставляли к месту сушки. Сушка сырья осуществлялась воздушно-теньевым методом в хорошо проветриваемом помещении без доступа прямых солнечных лучей. Для приготовления извлечений для анализа сырье измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстия 5 мм.

Выделение метаболитов проводилось методом водно-метанольной экстракции и последовательной дериватизации гидрохлоридом O-метилгидроксиламина (MOA) и N-метил-N-(триметилсилил)-трифлюороацетамидом (MSTFA). Анализ метаболитов проводился методом газовой хромато-масс-спектрометрии (GC-MS) с использованием 5%-фенил-95%-диметилсилоксановой колонки на хроматографе Agilent 7890, совмещенной с ионизацией в потоке электронов (EI)-TOF-MS. Обнаружение пиков производилось с использованием программного обеспечения Automated Mass Spectral Deconvolution & Identification System (AMDIS), идентификация отдельных метаболитов основана на индексах времен удерживания и поиску по спектральному подобию с использованием библиотек NIST14, GMD и внутренних библиотек. Количественное определение основано на интегрировании площадей хроматографических пиков на ионных хроматограммах, реконструированных для характеристических значений m/z (XIC, $\pm 0,5$ Da) и времен удерживания (RT) с использованием программного обеспечения LC-Quan. Калибровка основывается на методе добавления стандартов с использованием пяти уровней калибровки.

Анализ взаимосвязей «структура-активность» компонентов травы гравилата речного проводился при помощи специализированной версии программного обеспечения PASS – SAR BASE-antioxidant и SAR BASE-antioxidant-Integrity [6, 7].

Результаты и их обсуждение. В ходе метаболомного профайлингового исследования *Geum rivale L.* было выявлено 153 метаболита, из которых 27 соединений были отнесены к классу органических кислот, 5 – к производным многоатомных спиртов, 4 – к аминосоединениям, 19 – к углеводам и производным сахаров, 1 – к ацеталам. Еще 73 соединения на сегодняшний день не идентифицированы. Кроме того, 24 идентифицированных данным методом метаболита отнесены к группе вторичных метаболитов; из них 11 метаболитов – ксилонная кислота, 2-кетоглюконовая кислота, рибонная кислота, L-треоновая кислота, D-глюконовая кислота, ксилитол, сорбитол, мио-инозитол, галактинол, L-арабитол, адонитол – описаны для *Geum rivale L.* впервые.

На следующем этапе работы методами компьютерного моделирования были установлены потенциальные возможности применения выявленных метаболитов в качестве антиоксидантов, а также спрогнозированы возможные механизмы их действия. В частности, среди метаболитов *Geum rivale L.* был выявлен ряд наиболее вероятных механизмов антиоксидантного действия (вероятность проявления антиоксидантной активности приведена в виде численного значения в скобках):

- *radical adduct formation* – ксилоновая кислота (0,825); 2-кетоглюконовая кислота (0,829); рибоновая кислота (0,825); L-треоновая кислота (0,846); D-глюконовая кислота (0,825); ксилитол (0,787); сорбитол (0,787); мио-инозитол (0,847); L-арабитол (0,787); адонитол (0,787);
- *ARE-Dependent Genes Induction* – мио-инозитол (0,974); галактинол (0,993);
- *ROS-forming enzymes inhibition* – мио-инозитол (0,957); галактинол (0,975);
- *Altered Body Metabolism Normalization* – мио-инозитол (0,737); галактинол (0,943);
- *Antioxidative enzymes activation* – галактинол (0,817);
- *ROS-Forming Systems Inhibition* – мио-инозитол (0,738).

Прогноз на основе анализа взаимосвязей «структура-активность» показал, что впервые выявленные метаболиты потенциально могут проявлять антиоксидантную активность и рассматриваться в качестве кандидатов в новые перспективные молекулы для создания средств сопровождения лучевой терапии онкологических заболеваний.

Учитывая корреляционную связь между антиоксидантной активностью природных соединений и их способностью проявлять противолучевой эффект [2, 3], полученные нами результаты могут свидетельствовать о потенциальной возможности создания новых лекарственных средств для сопровождения лучевой терапии злокачественных новообразований из растительного сырья – травы *Geum rivale L.*

Заключение. В ходе исследования определен состав первичных и вторичных метаболитов травы *Geum rivale L.*, ряд метаболитов описан впервые. Проведено компьютерное прогнозирование вероятности проявления антиоксидантной активности выявленных метаболитов, выявлены возможные механизмы реализации антиоксидантного эффекта. Определен высокий антиоксидантный потенциал ряда метаболитов, что дает возможность рассматривать их в качестве перспективных молекул – потенциальных действующих веществ для создания новых лекарственных средств сопровождения лучевой терапии онкологических заболеваний.

Список литературы

1. Некласова Н.Ю., Жаринов Г.М., Гребенюк А.Н. Модификация радиочувствительности нормальных и опухолевых тканей при лучевой терапии злокачественных новообразований // Радиационная биология. Радиозкология. 2014. Т. 54. № 6. С. 597–605.
2. Weiss J.F., Landauer M.R. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals // Toxicology. 2003. Vol. 189. № 1-2. P. 1–20.
3. Тарумов Р.А., Башарин В.А., Гребенюк А.Н. Противолучевые свойства современных антиоксидантов // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. 2012. Т. 13. № 3. С. 682-700.
4. Okuda T., Yoshida T., Hatano T. New methods of analyzing tannins // Journal of Natural Products. 1989. Vol. 52. № 1. P. 1–31.
5. Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress // Critical Reviews of Biotechnology. 2010. Vol. 30. № 3. P. 161–175.
6. Дружиловский Д.С., Рудик А.В., Филимонов Д.А., Лагунин А.А., Глоризова Т.А., Поройков В.В. Веб-ресурсы для прогнозирования биологической активности органических соединений // Известия Академии наук. 2016. № 2. С. 384-393.
7. Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource // Chemistry of Heterocyclic Compounds. 2014. № 50 (3). P. 444-457.

РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ЦИТРАТ-СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГАФНИЯ (HfO₂)

Н.Р. Попова¹, Г.С. Таран², Д.Д. Колманович¹, А.Л. Попов¹, Т.О., Шекунова^{2,3}, В.К. Иванов²

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия, ²ФГБУН Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова, Москва, Россия, ³Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия e-mail: nellipopovaran@gmail.com

Резюме. В экспериментах на культуре клеток изучены радиосенсибилизирующие свойства цитрат-стабилизированных наночастиц оксида гафния (HfO₂). Показано, что наночастицы HfO₂ оказывают селективное радиосенсибилизирующее действие на культуры трансформированных клеток в условиях действия рентгеновского излучения, значительно снижая их жизнеспособность путем усиления эндогенного окислительного стресса, в конечном счете, приводящего к развитию апоптоза и гибели клетки.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, радиосенсибилизатор, оксид гафния, наночастицы

RADIOSENSITIZING PROPERTIES OF CITRATE-STABILIZED HAFNIUM OXIDE (HfO₂) NANOPARTICLES

N.R. Popova¹, G.S. Taran², D.D. Kolmanovich¹, A.L. Popov¹, T.O., Shekunova^{2,3}, V.K. Ivanov²

¹FGBUN Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Russia, ²FGBUN Institute of General and Inorganic Chemistry named after N.S. Kurnakov, Moscow, Russia, ³Moscow State University named after M.V. Lomonosova, Moscow, Russia e-mail: nellipopovaran@gmail.com

Summary. Using different types of cell culture, the radiosensitizing properties of citrate-stabilized hafnium oxide nanoparticles (HfO₂) were studied. It was shown that HfO₂ nanoparticles have a selective radiosensitizing effect under the X-ray irradiation, significantly reducing the viability of cancer cells, through the generation of oxidative stress, which leads to cell apoptosis.

Key words: ionizing radiation, radiosensitizer, hafnium oxide, nanoparticles

Одним из наиболее часто используемых способов лечения онкологических заболеваний является лучевая терапия. Между тем чтобы повысить эффективность и селективность лучевой терапии можно путем использования различных тераностиков (радиосенсибилизаторов и радиопротекторов). Одним из наиболее перспективных подходов в разработке новых эффективных тераностических агентов для лучевой терапии является использование наночастиц оксидов металлов, в частности оксида гафния [1, 2]. Высокая поглощающая способность по отношению к рентгеновскому излучению и относительно низкая токсичность нанокристаллического оксида гафния выделяет его в ряду других потенциальных соединений. Такой набор свойств дает возможность его использования в достаточно низких концентрациях, что позволит снизить побочные эффекты воздействия ионизирующего излучения на организм и повысить эффективность терапии. Таким образом, создание тераностических агентов на основе гафния станет решением одной из актуальных задач современной медицины.

Целью работы было получение коллоидных цитрат-стабилизированных наночастиц оксида гафния и исследование их цитотоксичности и радиосенсибилизирующих свойств на нормальных и трансформированных клетках человека *in vitro* в условиях воздействия рентгеновского излучения. Культуры клеток

NCTC L929 и глиобластомы человека U251 MG культивировались в стандартных условиях 5% CO₂ и 37 C, которые высевали в 96 луночные планшеты в плотности 15-20 тыс/см², и облучали на медицинской рентгеновской установке (уточнить ее показатели и условия облучения-напряжения расстояние и тд) в дозе 15 Гр. Наночастицы в различных концентрациях (0.3-5 мг/мл) вносились в культуру за 12 часов до облучения. Перед облучением культуральная среда заменялась на свежую, не содержащую наночастицы. В ходе работы были получены данные об ингибирующем действии цитрат-стабилизированных наночастиц оксида гафния на пролиферативную активность клеток глиобластомы, что выражалось в снижении их жизнеспособности (на более чем 50% при концентрации 2,5 мг/мл), а также увеличении доли мертвых клеток через 72 часа инкубации после облучения, при этом жизнеспособность нормальных клеток (NCTC L929) при высоких концентрациях наночастиц сохранялось уровне, близком к контрольным значениям (изменение менее 20%). Возможным механизмом селективной цитотоксичности является различная эффективность эндоцитоза наночастиц и их дальнейший процессинг в клетке. Между тем молекулярные механизмы такой избирательной цитотоксичности требуют дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук № МК-518.2019.3

Список литературы

1. Maggiorella L., Barouch G., Devaux C., Pottier A., Deutsch E., Bourhis J., Borghi E., Levy L. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles // [Future Oncol.](#) 2012. Vol. 8, № 9. P. 1167-81.
2. Marill J., M. Anesary N., Paris S. DNA damage enhancement by radiotherapy-activated hafnium oxide nanoparticles improves cGAS-STING pathway activation in human colorectal cancer cells // [Radiother Oncol.](#) 2019. Vol. S0167-8140, № 19. P. 33022-1.

**ОЦЕНКА МЕТОДОМ ЭНДОТЕСТА МОДИФИЦИРУЮЩЕГО
ДЕЙСТВИЯ рчАФП И рчГКСФ НА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

*Е.А. Пряхин¹, Г.А. Тряпицына^{1,2}, И.А. Шапошникова¹, Н.А. Обвинцева¹, Ю.И.
Остроумов³, П.С. Шмелин⁴, А.В. Аклев^{1,2}*

¹ФГБУН Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА
России, г. Челябинск, Россия; e-mail: *pryakhin@yandex.ru*

²ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия

³ОАО «Институт Инженерной Иммунологии», пос. Любучаны, Чеховский р-н,
Московская обл., Россия; ⁴ЦНИТИ «Техномаш», г. Москва, Россия

Резюме: С использованием метода эндотеста показано, что внутривенное введение самцам мышей стока CD1 в течение 5 суток после острого гамма-облучения в дозе 4 Гр липосом, содержащих рчАФП; липосом, содержащих рчГКСФ; липосом, содержащих рчАФП и рчГКСФ; а также раствора белка рчАФП статистически значимо повышает выживаемость гемопоэтических стволовых клеток у мышей стока CD1 по сравнению с группой облученного нелеченного контроля. Наиболее эффективным оказалось применение липосом, содержащих рчАФП и рчГКСФ: численность КОЕс в селезенке и масса селезенки в 3 раза превышают показатели в облученном контроле.

Ключевые слова: лучевая болезнь, стволовые гемопоэтические клетки, мыши, рчАФП, рчГКСФ, лечение, липосома

**ASSESSMENT MODIFYING EFFECT OF rhAFP AND rhGCSF OF THE
RADIOSENSITIVITY OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS USING THE
ENDOTEST**

*Е.А. Pryakhin¹, G.A. Tryapitsyna^{1,2}, I. A. Shaposhnikova¹, N.A. Obvintseva¹, Yu.I. Ostroumov³,
P. S. Shmelin⁴, A.V. Aklev^{1,2}*

¹Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia, e-mail:
pryakhin@yandex.ru

²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia; ³Institute of Engineering
Immunology, Lyubuchany, Moscow region, Russia; ⁴Technomash, Moscow, Russia

Summary: it was revealed that intravenous injection of liposomes containing rhAFP, liposomes containing rhGCSG, liposomes containing rhAFP and rhGCSG; and protein solution rhAFP within 5 days after the acute gamma-irradiation at a dose of 4 Gy statistically significantly increases the survival of hematopoietic stem cells (CFUs, endotest) in CD1mice compared with the group irradiated untreated control. The most effective was the use of liposomes containing rhAFP and rhGCSF: number of CFU in the spleen and spleen weight were 3 times higher than those in irradiated control.

Key words: acute radiation syndrome, hematopoietic stem cells, mice, rhAFP, rhGCSF, liposome

Одной из клинических форм лучевого поражения является острая лучевая болезнь (ОЛБ), развивающихся после кратковременного (от секунд до 3 сут) воздействия ионизирующего излучения в дозах, превышающих среднюю на тело в 1 Гр. ОЛБ - болезнь класса XIX «Травмы, отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин» (МКБ-10), входит в блок S00-T98 «Другие и неуточненные эффекты воздействия внешних причин»: T66 «Неуточненные эффекты излучения». В диапазоне доз до 10 Гр критической системой является кроветворная система - выживаемость гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) определяет тяжесть и исход костномозговой формы лучевой болезни. [1]. Поэтому изучение выживаемости гемопоэтических стволовых клеток является одним из информативных инструментов

оценки эффективности радиозащитных свойств лекарственных веществ [2]. В работе [3] показано, что трансдермальная аппликация на место радиационного поражения кожи (лучевой ожог кожи IIIA степени) у мышей липосом, содержащих рекомбинантные белки человека альфафетопротеин (рчАФП) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (рчГКСФ) в течение двух недель после облучения, приводит к повышению выживаемости стволовых клеток кожи в волосяных фолликулах по отношению к показателям у животных с нелеченым лучевым ожогом.

Целью данной работы являлась оценка методом эндотеста модифицирующего действия указанных цитокинов на радиочувствительность гемопоэтических стволовых клеток у мышей. В экспериментах на мышах тестировали препараты, полученные в ОАО «Институт инженерной иммунологии» ФМБА России [4]: Пустые липосомы содержат 10 мг/мл фосфолипидов (Lipoid S80, Германия); липосомы, содержащие 1 мг/мл рчАФП, 0,02 мг/мл рчГКСФ, 10 мг/мл фосфолипидов.; липосомы, содержащие 1 мг/мл рчАФП, 10 мг/мл фосфолипидов.; липосомы, содержащие 0,02 мг/мл рчГКСФ, 10 мг/мл фосфолипидов; раствор белка рчАФП, содержащий 1 мг/мл рчАФП; раствор белка рчГКСФ, содержащий 0,02 мг/мл рчГКСФ.

Оценку влияния отдельных компонентов (липосомы, рчАФП, рчГКСФ) и их комбинаций на состояние ГСК проводили с использованием метода эндотеста [2]. В качестве биологического объекта в экспериментах использованы самцы мышей стока CD1 в возрасте 3-4 мес., массой 24-26 г. Мышей облучали в дозе 4 Гр на установке ИГУР – 1М (мощность дозы 0,82 сГр/мин.) и затем внутривенно вводили препараты по 0,2 мл 5 раз: сразу после облучения, через 1, 3, 5, 7 сут после облучения (численность мышей в группах составляла 20 голов) (таблица 1).

Таблица 1. Схема эксперимента оценки влияния исследуемых препаратов на состояние ГСК у мышей стока CD1.

№ группы	Условия воздействия	Суммарная доза препаратов
1	Облучение 4 Гр	Физраствор. Суммарный объем 1 мл.
2	Облучение 4 Гр + пустые липосомы	Суммарная доза фосфолипидов составила 10 мг.
3	Облучение 4 Гр + липосомы, содержащие 1 мг/мл рчАФП.	Суммарная доза рчАФП составила 1 мг; фосфолипидов - 10 мг.
4	Облучение 4 Гр + липосомы, содержащие 0,02 мг/мл рчГКСФ	Суммарная доза рчГКСФ составила 0,02 мг; фосфолипидов - 10 мг.
5	Облучение 4 Гр + липосомы, содержащие 1 мг/мл рчАФП и 0,02 мг/мл рчГКСФ.	Суммарная доза рчАФП составила 1 мг; рчГКСФ - 0,02 мг; фосфолипидов - 10 мг.
6	Облучение 4 Гр + раствор, содержащий 1 мг/мл рчАФП.	Суммарная доза рчАФП составила 1 мг.
7	Облучение 4 Гр + раствор, содержащий 0,02 мг/мл рчГКСФ	Суммарная доза рчГКСФ составила 0,02 мг.

Как видно из таблицы 2, в группе, где мышам вводили липосомы, содержащие рчАФП (группа 3), регистрировалось статистически значимое по отношению к облученному контролю увеличение количества колониобразующих единиц в селезенке (КОЕс) на 171%, а массы селезенки - на 129%; при введении липосом, содержащих рчГКСФ (группа 4) - увеличение КОЕс на 83%, а при введении раствора белка рчАФП (группа 6) - увеличение количества КОЕс на 90%. Наиболее выраженный эффект регистрировался при введении животным липосом, содержащих рчАФП и рчГКСФ (группа 5) - количество КОЕс было увеличено на 196%, а масса селезенки – на 199% (у части животных наблюдался сливной рост колоний). При введении пустых липосом (группа 2) и суспензии белка рчГКСФ (группа 7) облученным животным не выявлено

статистически значимых отличий от контроля.

Таблица 2. Результаты эндотеста при многократном (курсовом) применении препаратов после гамма-облучения.

Экспериментальные группы	Масса селезенки, мг	КОЕс на селезенку
Группа 1) Облученный контроль (60 Гр) + физраствор	66 ± 9	15,2 ± 3,6
Группа 2) 4 Гр + пустые липосомы	76 ± 12 t = 0,63; p = 0,54	18,8 ± 3,8 t = 0,68; p = 0,52
Группа 3) 4 Гр + липосомы с рчАФП	151 ± 18 t = 4,23; p = 0,003	41,3 ± 3,1 t = 5,46; p = 0,001
Группа 4) 4 Гр + липосомы с рчГКСФ	91 ± 11 t = 1,75; p = 0,12	27,9 ± 3,1 t = 2,69; p = 0,028
Группа 5) 4 Гр + липосомы с рчАФП и рчГКСФ	197 ± 37 t = 3,42; p = 0,009	> 45 (сливной рост) t = 8,3; p = 0,00003
Группа 6) 4 Гр + рчАФП	90 ± 14 t = 1,41; p = 0,2	28,9 ± 4,3 t = 2,44; p = 0,041
Группа 7) 4 Гр + рчГКСФ	90 ± 17 t = 1,22; p = 0,26	25,2 ± 4,0 t = 1,86; p = 0,1
Примечание: t – коэффициент Стьюдента; p – уровень значимости.		

Выводы:

1. По показателям эндотеста внутривенное введение самцам мышей стока CD1 в течение 5 суток после острого гамма-облучения в дозе 4 Гр липосом, содержащих рчАФП; липосом, содержащих рчГКСФ; липосом, содержащих рчАФП и рчГКСФ; а также раствора белка рчАФП статистически значимо повышает выживаемость гемопоэтических стволовых клеток у мышей стока CD1 по сравнению с группой облученного нелеченного контроля.

2. Наиболее выраженные эффекты со стороны гемопоэтических стволовых клеток у облученных в сублетальных дозах мышей наблюдаются при внутривенном введении липосом, содержащих белки рчАФП и рчГКСФ: увеличение количества КОЕс и массы селезенки в 3 по отношению к облученному контролю.

3. Комбинированный липосомальный препарат, содержащий рчАФП и рчГКСФ, может быть эффективно использован для экстренной профилактики и лечения острой лучевой болезни.

Список литературы

1.Т.М. Fliedner, N.J. Chao, J.L. Bader et al. Stem Cells, Multi-organ Failure in Radiation Emergency Medical Preparedness: A US/European Consultation Workshop // Stem Cells. 2009 May; 27(5): 1205–1211.

2. Переверзев А.К. Кроветворные колониеобразующие клетки и физические стресс-факторы. // Л.: Наука, 1986. 172с.

3. Пряхин Е.А., Тряпицына Г.А., Шапошникова И.А. и др. Влияние липосомальных препаратов, содержащих рекомбинантные белки человека альфа-фетопротейн и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, на течение лучевого ожога кожи IIIA степени у мышей // Радиационная биология. Радиозэкология. 2019. Т. 59. № 2. С. 205-213

4.Тряпицына Г.А., Пряхин Е.А., Атаманюк Н.И. и др. Влияние липосомального препарата, содержащего белки альфа-фетопротейн и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, на патогенез лучевого ожога кожи у мышей // Радиационная биология. Радиозэкология. 2018. Т. 58. № 3. С. 251–261.

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОГЛИИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВЫ В РАЗНЫХ ДОЗАХ

А.В. Родина, Ю.П. Семочкина, Г.А. Посыпанова, М.Г. Ратушняк, Е.Ю. Москалева

НИЦ Курчатовский институт, г. Москва, Россия, e-mail: Moskaleva_EY@nrcki.ru

Резюме. После γ -облучения головы мышей в дозах 4 и 8 Гр обнаружено снижение количества клеток покоящейся микроглии через 1 месяц, а через 2 месяца – после облучения в дозах 2, 4 и 8 Гр. Количество клеток активированной микроглии снижалось пропорционально дозе облучения через 3 суток, не отличалось от контроля через 1 месяц и было снижено через 2 месяца после облучения в дозе 8 Гр. Доля клеток активированной микроглии через 1 и 2 месяца после воздействия была повышена при всех изученных дозах.

Ключевые слова: микроглия; головной мозг; гамма-излучение; нейровоспаление; отдаленные последствия

ANALYSIS OF MICROGLIA IN THE MOUSE BRAIN AFTER CRANIAL IRRADIATION AT DIFFERENT DOSES

A.V. Rodina, Y.P. Semochkina, Posypanova, M.G. Ratushnyak, E.Yu. Moskaleva

National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

e-mail: Moskaleva_EY@nrcki.ru

Summary. After cranial γ -irradiation at doses of 4 and 8 Gy, a decrease in the number of resting microglia was seen after 1 month. In 2 months it was seen at doses of 2, 4 and 8 Gy. The number of activated microglia decreased in proportion to the radiation dose after 3 days, did not differ from the control after 1 month and was reduced 2 months after irradiation at a dose of 8 Gy. The part of activated microglia cells after 1 and 2 months after exposure was increased at all doses studied.

Key words: microglia; cranial irradiation; neuroinflammation; late effects.

В настоящее время активно изучаются механизмы нарушения функций ЦНС при облучении мозга в связи с актуальностью разработки методов профилактики развития отдаленных последствий лучевой терапии в виде когнитивных нарушений [1]. Хорошо известно, что при облучении области головы и шеи происходит угнетение нейрогенеза, вызванное гибелью высоко радиочувствительной популяции нейральных стволовых и прогениторных клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины, что приводит к снижению образования новых нейронов и нарушению их функций [2]. Кроме того, в отдаленный период после облучения возможно повреждение клеток ЦНС в результате развития нейровоспаления и сопровождающего его окислительного стресса, в основе которого лежит активация клеток микроглии и секреция ими провоспалительных цитокинов, что в свою очередь вызывает повреждение клеток мозга [3]. Совокупность этих процессов в отдаленный период после облучения может приводить к нарушению способности к обучению и снижению памяти. При лучевой терапии опухолей используют режим фракционированного облучения при дозах 2 или 4 Гр на фракцию. В связи с этим целью работы на данном этапе явилось исследование влияния локального γ -облучения головы в дозах 2, 4 и 8 Гр на покоящуюся и активированную микроглию в мозге в динамике после радиационного воздействия.

Материалы и методы. В экспериментах использовали самцов мышей инбредной линии C57BL/6, массой 18 - 21 г, которых содержали в стандартных условиях вивария. Животных подвергали локальному облучению головы при действии γ -излучения от

источника кобальт-60 на установке «ГУТ-200М» в дозах 2, 4 и 8 Гр при мощности дозы 2,35 Гр/мин. Выделение клеток из головного мозга контрольных и облученных мышей проводили в соответствии с методом [4]. Для каждого срока исследования одновременно анализировали мозг контрольных и облученных животных одинакового возраста. После транс кардиальной перфузии для удаления клеток крови, которую проводили при анестезии мышей с использованием смеси зоветила и рометара, извлекали мозг, удаляли мозжечок и обонятельные доли, и готовили суспензию клеток мозга с использованием аккутазы для извлечения клеток из ткани. Клетки ресуспендировали в 20%-ном изотоническом растворе перколла, на который наслаивали раствор Хэнкса. Клетки центрифугировали для отделения миелина, который концентрировался в интерфазе. Супернатант удаляли, осадок клеток дважды промывали в фосфатном-солевом буфере (ФСБ), ресуспендировали в ФСБ, добавляли трипановый синий для подсчета клеток в камере Горяева. После подсчета клетки использовали для анализа.

Для идентификации микроглии клетки головного мозга окрашивали антителами к антигену CD11b, конъюгированными с фикоэритрином, и к CD45, конъюгированными с Alexa 488. Клетки микроглии идентифицировали как субпопуляцию CD11b⁺/CD45^{low} после двойного окрашивания антителами к CD11b и к CD45. Популяция клеток с фенотипом CD11b⁺/CD45^{high} соответствует клеткам активированной микроглии и макрофагам. Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD Biosciences, США), оснащенном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм, и диодным красным лазером ($\lambda=635$ нм) (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии).

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием компьютерной программы "Origin". Данные представляли в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. Достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты. При исследовании влияния локального γ -облучения головы мышей в дозах 2, 4 и 8 Гр на количество клеток покоящейся и активированной микроглии в мозге через 3 суток и 1 и 2 месяца после воздействия обнаружено, что через 1 месяц после облучения в дозах 4 и 8 Гр количество клеток покоящейся микроглии снижено, в то время как через 3 суток оно не отличалось от контроля. Через 2 месяца после облучения имело место дозозависимое снижение количества этих клеток при всех исследованных дозах. Количество клеток активированной микроглии снижалось пропорционально дозе облучения через 3 суток, не отличалось от контроля через 1 месяц и было снижено через 2 месяца после облучения в дозе 8 Гр. При расчете доли клеток активированной микроглии в составе микроглии показано, что этот показатель был снижен через 3 суток после облучения, но через 1 и 2 месяца после воздействия он был повышен при все дозах. При активация микроглии в ЦНС могут образовываться клетки с разными свойствами. Микроглия с фенотипом M1 преобладает в зонах повреждения и оказывает цитотоксическое действие, благодаря секреции провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β) и активных метаболитов кислорода и азота, и обеспечивает первую линию защиты при повреждении, а микроглия с фенотипом M2 оказывает нейропротективное действие, секретирует противовоспалительные цитокины IL-4 и IL-13 [5]. Особенности изменения «провоспалительной» и «нейропротективной» микроглии после облучения не изучены. Гибель M2 клеток микроглии после облучения может приводить усилению процессов повреждения клеток мозга.

Таким образом, обнаружено длительное дозозависимое снижение количества клеток покоящейся микроглии и увеличение доли клеток активированной микроглии в

отдаленный период после облучения, что может свидетельствовать о развитии нейровоспаления уже через 2 месяца после локального облучения головы мышей в дозах 4 и 8 Гр.

Список литературы

1. Smart D. Radiation Toxicity in the Central Nervous System: Mechanisms and Strategies for Injury Reduction. *Semin Radiat Oncol.* 2017. 27(4): 332-339.
2. Raber J, Rola R, LeFevour A. et al. Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat. Res.* 2004; 162(1): 39-47.
3. Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A. et. al. Microglia in neurological diseases: a road map to brain-disease dependent-inflammatory response. *Front Cell Neurosci.* 2018; 12: 488. 19.
4. Legroux L, Pittet CL, Beauseigle D, et. al. An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytometry. *J. Neurosci. Methods.* 2015; 247: 23-31.
5. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology.* 2016; 53(2):1181-1194.

КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ γ ,n-ИЗЛУЧЕНИЯ.

А.В. Родина, Ю.П. Семочкина, В.Г. Шуватова, Е.Ю. Москалева

НИЦ Курчатовский институт, г. Москва, Россия, e-mail: Rodina_AV@nrcki.ru

Резюме. Исследовано влияние γ , n-облучения головы в дозе 1 Гр на количество активированной микроглии, уровень GFAP и цитокинов в мозге, на поведение и когнитивные функции мышей. Тревожное поведение, наблюдаемое в ранний период (7 сут) после облучения, в сочетании с обнаруженными клеточными и молекулярными изменениями в мозге через 2 месяца после воздействия при отсутствии когнитивных дисфункций, может указывать на ранние стадии развития нейровоспаления после облучения головы при действии γ ,n-излучения.

Ключевые слова: мозг; когнитивные нарушения; γ ,n-излучение; микроглия; нейровоспаление.

CELLULAR AND MOLECULAR CHANGES IN THE BRAIN AFTER CRANIAL γ ,n- IRRADIATION.

A.V. Rodina, Y.P. Semochkina, V.G. Shuvatova, E.Yu. Moskaleva

National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia, e-mail:

Rodina_AV@nrcki.ru

Summary. The effects of cranial γ ,n-irradiation at a dose of 1 Gy on the quantity of activated microglia cells, the level of GFAP and cytokines in the brain, on behavior and cognitive functions of mice were studied. The anxiety-like behavior observed early (7 day) after irradiation combined with cellular and molecular changes in the brain of animals detected two months after exposure without cognitive dysfunction may indicate early stages of neuroinflammation after cranial γ ,n-irradiation.

Key words: brain; cognitive dysfunction; γ ,n- irradiation; microglia; neuroinflammation.

This work was supported by RFBR grant № 17-29-01033.

Лучевая терапия остается основным методом лечения первичных и метастатических новообразований, в области головы и шеи. Прогресс в этой сфере связан с использованием ускоренных частиц – протонов и тяжелых ионов [1], а также получаемых в ядерных реакторах нейтронов [2]. При облучении опухоли протонными пучками в пике Брэгга на нормальные ткани пациента помимо протонов действуют нейтроны, которые образуются в результате взаимодействия протонов с облучаемыми тканями пациента. Известно, что в отдаленный период после облучения головного мозга возможно нарушение функций ЦНС, и даже умеренные дозы ионизирующего излучения могут вызывать повреждение мозга, приводя к когнитивным расстройствам и изменению психоэмоционального состояния [3, 4]. Когнитивные нарушения могут быть следствием действия нескольких факторов: дозо-зависимого снижения образования новых нейронов в зубчатой субстанции гиппокампа в результате повреждения нейральных стволовых клеток, нарушения функций нейронов, активации микроглии и секреции клетками микроглии провоспалительных факторов, усиливающих повреждение нейронов и

вызывающих астроглиоз [5].

Целью работы явилось исследование влияние γ ,n-облучения головы в дозе 1 Гр на количество клеток активированной микроглии и астроцитов, уровень провоспалительных цитокинов в мозге, и взаимосвязь этих показателей с поведением и когнитивными функциями экспериментальных животных. Учитывая, что ОБЭ нейтронов при этих условиях составляет 2-2,5 [6], доза γ ,n-излучения, равная 1 Гр, близка к разовой дозе γ -излучения, равной 2 Гр, используемой при фракционированном облучении опухолей.

Материалы и методы. В экспериментах использовали самцов мышей инбредной линии C57BL/6 массой 18 - 21 г, которых содержали в стандартных условиях вивария. Облучение головы при действии смешанного γ ,n-излучения проводили в коллимированном пучке нейтронов и гамма-квантов ядерного реактора ИР-8. В разных сериях облучения мощность реактора менялась от 4,5 до 6,5 МВт. Поглощенные дозы рассчитывали, как описано ранее [7]. Двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность мышей оценивали в тесте «Открытое поле». Для изучения пространственного обучения и памяти у животных до и после облучения использовали тест «Водный лабиринт Морриса». После проведения поведенческих тестов мышей анестезировали, проводили транскардиальную перфузию, извлекали мозг, удаляли мозжечок, обонятельные доли и готовили суспензию клеток мозга с использованием аккутазы для извлечения клеток из ткани. Клетки ресуспендировали в 20%-ном изотоническом растворе перколла, на который наслаивали раствор Хэнкса. Клетки центрифугировали для отделения миелина, который концентрировался в интерфазе. Супернатант удаляли, осадок клеток дважды промывали в фосфатном-солевом буфере (ФСБ), ресуспендировали в ФСБ, добавляли трипановый синий для подсчета клеток в камере Горяева. После подсчета клетки использовали для анализа. Для идентификации микроглии клетки головного мозга окрашивали антителами к антигену CD11b, конъюгированными с фикоэритрином, и к CD45, конъюгированными с Alexa 488. Клетки микроглии идентифицировали как субпопуляцию CD11b⁺/CD45^{low} после двойного окрашивания антителами к CD11b и к CD45. Популяция клеток с фенотипом CD11b⁺/CD45^{high} соответствует клеткам активированной микроглии и макрофагам. Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD Biosciences, США) (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии). Определение уровня цитокинов IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-1 β , а также глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в экстрактах головного мозга проводили с помощью иммуноферментного анализа при использовании наборов фирмы R&D Systems в соответствии с указаниями фирмы и выражали в пг/мл. Мозг каждой мыши гомогенизировали в 300 мкл буфера для экстракции (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA-Na, 1% Triton X, ингибитор протеаз) и разрушали клетки с помощью ультразвука. После центрифугирования при 15 000 x g 10 мин при 4⁰С, супернатант собирали и хранили при - 80⁰С. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием компьютерной программы "Origin". Достоверными считали результаты при p < 0,05.

Результаты. При исследовании влияния γ , n-облучения головы в дозе 1 Гр на поведение и когнитивные функции взрослых самцов мышей C57BL/6 через 7 дней, 1 и 2 месяца после воздействия было обнаружено, что на 7 сутки достоверно снижалась общая двигательная активность у животных по показателям «общий пройденный путь» и «общая средняя скорость» по

сравнению с контрольной группой, но через 14 суток и через 2 месяца эти показатели не различались. Результаты теста «Водный лабиринт Морриса» свидетельствовали об отсутствии нарушения пространственной ориентации и памяти у животных через 2 месяца после облучения. При анализе количества клеток микроглии с фенотипом CD11b⁺/CD45^{low} в мозге мышей через 2 мес после γ ,n-облучения головы обнаружено, что их уровень не отличался от контроля, но уровень активированной микроглии CD11b⁺/CD45^{high} был достоверно повышен. Исследование уровня GFAP в экстрактах головного мозга до и в динамике после облучения показало, что через 1 месяц после γ ,n-облучения в дозе 1 Гр наблюдался достоверно повышенный по сравнению с контрольной группой уровень GFAP, который через 2 месяца не отличался от контроля. Однако повышения уровня провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- α и цитокина TGF- β в экстрактах мозга через 1 месяц после γ ,n-облучения в дозе 1 Гр не наблюдалось, но уровень IL-1 β был повышен через 2 месяца после воздействия. Полученные результаты позволяют констатировать, что повышение количества астроцитов через месяц после облучения, а также повышение уровня активированной микроглии и IL-1 β через 2 месяца после облучения свидетельствуют о развитии нейровоспаления. Тревожное поведение животных, наблюдаемое в ранние сроки после облучения, в сочетании с клеточными и молекулярными изменениями в мозге животных, обнаруженными в течение 2 месяцев после воздействия при отсутствии когнитивных дисфункций, может указывать на ранние стадии развития нейровоспаления при повреждении мозга после действия γ ,n-излучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-29-01033.

Список литературы

1. Zacharatou JC, Paganetti H. Risk of developing second cancer from neutron dose in proton therapy as function of field characteristics, organ, and patient age // *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008. Vol. 72, № 1. P. 228-235.
2. Musabaeva L.I., Golovkov V.M. Fast Neutron Therapy for Cancer Patients // *Siberian Journal of Oncology*. 2015. № 2: 88–94.
3. Yang M, Kim H, Kim J, Kim SH, Kim JC, Bae CS, Kim JS, Shin T, Moon C. Fast neutron irradiation deteriorates hippocampus-related memory ability in adult mice // *J. Vet. Sci*. 2012. Vol. 13, № 1. P. 1-6.
4. Mineyeva OA, Barykina NV, Bezriadnov DV, Latushkin ST, Ryazanov AI, Unezhev VN, Shuvaev SA, Usova SV, Lazutkin AA. Suppressed neurogenesis without cognitive deficits: effects of fast neutron irradiation in mice // *Neuroreport*. 2019. Vol. 30, № 8. P. 538-543.
5. Parihar V.K., Acharya M.M., Roa D.E., Bosch O., Christie L.A., Limoli C. L. Defining functional changes in the brain caused by targeted stereotaxic radiosurgery // *Transl.Cancer Res*. 2014. №3. P. 124–137.
6. Семочкина Ю.П., Родина А.В., Москалева Е.Ю. [и др.]. Злокачественная трансформация мезенхимальных стволовых клеток из разных тканей мыши после смешанного гамма-нейтронного облучения *in vitro* // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2019. Том 64, № 1, 5-14 с.
7. Arzumanov SS., Safronov VV., Strepetov A. N. Determination of a Dose Absorbed in a Biological Sample under Mixed Gamma–Neutron Irradiation // *Technical Physics*. 2018. Vol. 63, № 10. P. 1533–1536.

РАДИОМОДИФИКАТОР БЕТАЛЕЙКИН НЕ ЗАЩИЩАЕТ ПЕРЕВИВНУЮ КАРЦИНОМУ ЛЬЮИСА У МЫШЕЙ ОТ ОБЛУЧЕНИЯ

Л.М.Рождественский¹, А. А. Липенгольц^{1,2}, В.В.Зорин¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И.Бурназяна», Москва, Россия, ² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
lemrod@mail.ru

Резюме. На модели перевивной карциномы Льюиса (имеющей рецепторы к ИЛ-1) у мышей оценивали влияние двукратного (за сутки до локального R-облучения в дозе 20 Гр и сразу после) введения беталейкина (рч ИЛ-1β) в дозе 50 мкг/кг на рост опухоли (по измеряемому объему). В 3-х сериях опыта не было отмечено защитного влияния беталейкина на опухоль по критериям возобновившегося роста, а в одной из серий отмечен даже туморицидный эффект (в этой же серии значительно более медленный рост необлученной опухоли). Беталейкин перспективен при лучевой терапии опухолей.

Ключевые слова: лучевая терапия опухолей, цитокины, беталейкин,

RADIOMODIFICATOR BETALEUKINE DOES NOT PROTECT LEWIS CARCINOMA GRAFTED IN MICE AGAINST LOCAL IRRADIATION

L.M.Rozhdestvensky¹, A.A.Lipengolts^{1,2}, V.V.Zorin¹

¹State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biological Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia ² N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology

Summary. It had been evaluated the betaleukine (rh IL-1β) influence on the growth of locally R-irradiated Lewis carcinoma grafted in mice. Betaleukine was administered i/p twice (20 h before and immediately after exposure) at the dose 20 Gy. Carcinoma growth was evaluated on measured volume change. It was shown that betaleukine protected the carcinoma never in 3 series of experiments, but it increased the tumor injury even in one of them. That correlated with the most weak unirradiated tumor growth in the same series. It is concluded that betaleukine is promising for tumor radiotherapy

Key words: tumor radiation therapy, cytokines, betaleukine

Лучевая терапия опухолей (ЛТО) является естественным полигоном испытания и применения противолучевых средств (ПЛС), разрабатываемых для медицинского обеспечения радиационных инцидентов при различных чрезвычайных ситуациях. Речь идет о ПЛС раннего и экстренного применения (Индралин, Беталейкин, Тромбопоэтин)

В литературе представлены работы с позитивным результатом по применению в курсах ЛТО в клинике различных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 α/β, ИЛ-2, TNF)[1-2]. В России был разработан рч ИЛ-1β (Беталейкин), сертифицированный как средство экстренной терапии лучевых поражений [3-4]. Беталейкин применялся при ЛТО в клинике и способствовал поддержанию лейкоцитов на более высоком уровне [5]. Целью нашего исследования была оценка влияния беталейкина на рост облученной перевиваемой (мышам) карциномы Льюиса, имеющей рецепторы к ИЛ-1 [6].

В эксперименте из 3-х серий были использованы мыши самки С57В1/6 с массой 20-22 г., которым трансплантировали подкожно в правую лапу 14% суспензию измельченной опухолевой ткани в объеме 0,2 мл.. Далее составляли следующие

группы: по 8 особей: необлучаемые (Контроль 1, K1), облучаемые (Контроль 2, K2), облучаемые с введением беталейкина (Обл+Бл). Локальное рентгеновское облучение опухоли в дозе 20 Гр производили на R-аппарате РУСТ М1. Беталейкин производства ГосНИИ ОЧБ, СПб, лиофилизированный, по 1 мкг/амп, растворяли перед использованием в 0,9 % NaCl и вводили в/бр в дозе 50 мкг/кг (в первых 2-х сериях 2-хкратно: за 24.ч до облучения и сразу после, в 3-й серии только до облучения). Динамику роста опухоли оценивали по изменению ее объема, измеренного с помощью штангенциркуля и рассчитанного по формуле эллипсоида.

Динамику роста опухоли аппроксимировали линейными зависимостями раздельно в стадии практически отсутствия роста после облучения и восстановившегося роста с помощью программы Statistica 6. Критериями оценки влияния воздействий на рост опухоли были выбраны: время задержки роста опухоли (сут) и скорость роста в период восстановившегося роста (мм³/сут). [Табл.]

Таблица Критерии оценки динамики роста карциномы Льюиса

Серии	Срок отсутствия роста (сут)			Скорость роста (мм ³ /сут)		
	K1	K2	Обл+Бл	K1	K2	Обл+Бл
1-я	0	9	13	232,9	207,9	157,1
2-я	0	8,5	9	524,1	491,8	503,4
3-я	0	8	8	460,7	490	517

Из данных, представленных в Табл., следует, что по обоим критериям оценки Беталейкин не оказывает радиозащитного действия на карциному Льюиса несмотря на наличие у клеток этой опухоли рецептора к ИЛ-1. Известно, что защитное действие ИЛ-1 реализуется через рецептор и последующую сигнальную цепочку [7]. При этом введение Беталейкина необлученным мышам с перевитой опухолью в этой же серии никакого влияния на темп ее роста не оказало.

Другим важным моментом является то обстоятельство, что в одном из 2-х опытов с 2-кратным введением беталейкина (1-я и 2-я серии) был отмечен даже туморицидный эффект беталейкина (1-я серия), выразившийся в увеличении времени задержки роста опухоли на 45% и дальнейшем снижении скорости роста на 25 %. При этом, именно в 1-й серии рост опухоли у интактных мышей был выражен заметно слабее, чем в 2-х других сериях. Можно предположить, что отмеченный феномен связан с состоянием иммунной системы у разных партий мышей.

Предварительный вывод из результатов проведенных опытов состоит в том, что введение Беталейкина за 24 ч до облучения и сразу после воздействия мышам с перевитой карциномой легкого Льюиса в начальной стадии роста опухоли (9-10 сутки после перевивки) не приводит к защите опухоли и может даже сопровождаться дополнительным туморицидным действием. Условия проявления последнего остаются невыясненными.

Список литературы

- 1.Nemunaitis J., Appelbaum FR et al. Phase I study of recombinant IL-1 β in patients undergoing autologous bone marrow transplant for acute myelogenous leukemia.// Blood 1994, 83(12), 3473-9
- 2.Proietti E, Tritarelli E et al. Combined IL-1 β /IL-2 treatment in mice: synergistic myelostimulatory activity and protection against cyclophosphamide-induced myelosuppression. // Cancer Res 1993, 53(3), 569-76.
- 3.Рождественский Л.М. Интерлейкин-1 – центральный провоспалительный цитокин плейотропного действия в аспекте лечения лучевых поражений в эксперименте и клинике // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2001. Т. 46. № 4. С. 5–11.

4. А.Н.Гребенюк, В.И.Легеза. Противолучевые свойства интерлейкина-1. Издат. Фолиант, 2012, 216 с.
5. Гершанович М.Л., Филатова Л.В. Беталейкин (рекомбинантный интерлейкин_1 β) – эффективный стимулятор и протектор лейкопоэза в условиях комбинированной химиотерапии злокачественных опухолей: Пособие для врачей. СПб.: Новая Альтернативная Полиграфия, 2008. С. 1–16.
6. Moreb S., Schweder M. Human A1, a BCL-2-related gene, is induced in leukemic cells by Cytokines as well as differentiating factors. // *Leukemia* 1997, 11, 998-1004.
7. Neta R., Oppenheim J.J., Wang J. et al. Synergy of IL-1 and stem cell factor in radioprotection of mice is associated with IL-1 up-regulation of mRNA and protein expression for c-kit on bone marrow cells // *J. Immunol.* 1994. V. 153. P. 1536–1543.

**ИНФРАКРАСНОЕ ТЕРМОГРАФИЧЕСКОЕ (ИКТ) ИССЛЕДОВАНИЕ
ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА ГАЛАЗОЛИН ПРИ МЕСТНОМ
ЛУЧЕВОМ ПОРАЖЕНИИ ЗДОРОВЫХ ТКАНЕЙ**

Н.М. Ставракова¹, В.Н. Мальцев¹, М.Д. Воронцова¹, А.В. Даценко¹, А.А. Иванов^{1,2}.

¹ФГБУ «ГНЦ РФ – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва, Россия

²ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

e-mail: a1931192@mail.ru

Резюме. При локальном кратковременном рентгеновском облучении хвостов крыс в дозе 100 Гр препарат галазолин проявляет себя как противолучевое средство и снижает проявления местных лучевых поражений, регистрируемых по клиническим признакам и с помощью ИКТ, а также сокращает период эпителизации.

Ключевые слова: локальное облучение, местные лучевые поражения, галазолин, эпидермит, инфракрасная термография.

**INFRARED THERMOGRAPHIC (IRT) STUDY OF THE PROTECTIVE EFFECT
OF THE DRUG GALAZOLIN IN LOCAL RADIATION DAMAGE TO HEALTHY
TISSUES**

N.M. Stavrakova¹, V.N. Malcev¹, M.D. Vorontsova¹, A.V. Datsenko¹, A.A. Ivanov^{1,2}.

¹State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Moscow, Russia

²Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

e-mail: a1931192@mail.ru

Summary. When a local short-term x-ray irradiation of the tails of rats at a dose of 100 Gr of the drug galazolin manifests itself as a radioprotective means and reduces the symptoms of local radiation injuries recorded by clinical signs and using IRT, and also shortens the period of epithelialization.

Key words: local irradiation, local radiation injury, galazolin, epidermitis, infrared thermography.

Местные лучевые поражения онкологических больных в форме эпидермитов и мукозитов с достаточно высокой частотой возникают после лучевой терапии [1, 2]. Снижение поражений здоровых тканей после радиационного воздействия достигается при системном и местном применении классических радиопротекторов: амифостина [3, 4], индралина и др. [5]. В основе противолучевого эффекта этих препаратов из группы α_1 - адреномиметиков лежит их способность вызывать гипоксию в радиочувствительных тканях. Поскольку данные радиопротекторы являются малодоступными и редкоприменяемыми препаратами, у нас возникла идея применять для местной защиты сосудосуживающий препарат галазолин - производное имидазола, α_1 и α_2 - адреномиметик для интраназального применения [6]. Важной задачей в клинике местных лучевых поражений является объективная оценка процессов поражения и восстановления [7]. Для этого была сделана попытка применить термографию [8]. Целью данной работы стало исследование принципиальной возможности местного применения галазолина для защиты здоровых тканей при локальном облучении и значения ИКТ при оценке течения лучевого поражения.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 20 самках и самцах белых беспородных крыс с исходной массой тела 180-200 г. Животные находились в условиях вивария, регулирования светового режима, при температуре 22-23°C, имели свободный доступ к брикетированному корму и воде.

Облучение: Однократное кратковременное дорзо-вентральное местное (хвосты) облучение крыс осуществляли на рентгеновской биологической установке РУБ ЛНК-268 при напряжении 70 кВ, ток пучка 8 мА, фильтр алюминиевый 0,1 мм, коллиматор (свинец) диаметр 20 мм, толщина 7 мм. Мощность дозы в контейнере с крысами $22,7 \pm 5\%$ Гр/мин. Доза облучения составляла 100 Гр. В качестве дополнительного метода исследования при комплексной оценке лучевых повреждений кожи также рекомендуют проведение инфракрасной термографии (ИКТ) на всех стадиях развития патологического процесса любой локализации (конечности, грудная и брюшная части тела, шея и голова) [7, 8, 9, 10].

За 10 мин до облучения наносили на хвосты опытной группы препарат галазолин, на хвосты контрольной группы – глицерин. Контроль развития сосудосуживающего эффекта под влиянием препарата осуществляли с помощью тепловизора.

Для оценки радиопротекторного эффекта препарата галазолин использовали показатели: общепфизиологические (динамика массы тела), клинические (гиперемия, сухой дерматит, влажный дерматит).

Неинвазивную динамическую ИКТ поверхности кожи хвоста крыс проводили с помощью тепловизора Flir SC660 (Flir, Швеция) в лабораторных условиях при температуре воздуха 18-24 °С и относительной влажности 60-75%. Расстояние от объектива тепловизора до объекта исследования составляло 50 см. Температурные показатели поверхности кожи регистрировали на участке хвоста на удалении 1 и 2 см от его основания.

В работе использовали препарат галазолин 0,1% капли интраназальные [6].

Статистическая обработка проведена с помощью критериев Стьюдента и Манна-Уитни (программа BIOSTAT).

Результаты: С помощью ИКТ установили выраженное снижение температуры кожи хвоста крыс при нанесении на него препарата галазолин за счет выраженного сосудосуживающего эффекта, сохранявшегося, по крайней мере, 15-20 мин. Наблюдение за животными в течение 90 дней после облучения показало, что в опытной группе повышение массы тела составило 50,4%, в контрольной – 51,1% от начальной. Скрытый период составил $13 \pm 0,62$ сут и $12,8 \pm 0,62$ сут в опытной и контрольной группе соответственно. Период сухого эпидермита длился $2 \pm 0,62$ сут в опытной группе и $5,4 \pm 0,62$ сут в контрольной, влажный эпидермит – $5 \pm 0,28$ сут в опытной группе и $3,6 \pm 0,28$ сут в контрольной; струп находился на хвостах контрольной группы $21,8 \pm 0,06$ сут, на хвостах контрольной группы – $57 \pm 0,06$ сут; эпителизация кожи хвоста крыс опытной группы длилась $5,65 \pm 0,09$ сут, у контрольной группы эпителизация не завершилась до окончания эксперимента; полное заживление произошло на $52,28 \pm 0,03$ сут в опытной группе, в контрольной группе полного заживления не произошло до окончания эксперимента (90 сут) (различия с контрольной группой статистически значимы, $p=0,03$).

Динамика изменений термографических параметров поверхности кожи у облученных лабораторных крыс была линейной и характеризовалась гипертермией в среднем на 1.63 и на 0.46 °С через 5-7 сут и 14-16 сут после локального воздействия ионизирующей радиации соответственно. На 33-35 сут после облучения имели место признаки выраженной гипотермии на -0.66 °С по сравнению со среднегрупповыми температурными показателями поверхности кожи хвоста группы виварного контроля. У подопытных биообъектов, у которых поверхность кожи хвоста предварительно перед облучением была обработана галазолином, температурные показатели в среднем повышались на 0.5 °С через 5-7 сут и снижались на -1.48 °С через 14-16 сут после облучения. На 33-35 сут после локального облучения температура поверхности кожи

хвоста у данной группы биообъектов повышалась в среднем на 2.44 °С

Заключение: Полученные данные свидетельствуют, что препарат галазолин оказывает положительное радиозащитное действие на течение местного лучевого поражения кожи хвоста крыс. Метод динамической дистанционной ИКТ кожных покровов может быть использован для диагностики степени выраженности местного лучевого поражения и прогноза его развития. Данные ИКТ могут быть использованы для прогнозирования возможных осложнений, связанных с радиационными повреждениями кожи при проведении лучевой терапии опухолей внутренних органов.

Список литературы

1. Lalla RV, Bowen J, Barasch A et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy // *Cancer* – 2014. – Vol. 120. – P. 1453-1461. doi: 10.1002/cncr.28592
2. Wright JL, Takita C, Reis IM et al. Racial variations in radiation-induced skin toxicity severity: data from a prospective cohort receiving postmastectomy radiation // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2014. – Vol. 90. – P. 335-343. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.06.042.
3. Dunst J, Semlin S, Pigorsch S. et al. Intermittent use of amifostine during postoperative radiochemotherapy and acute toxicity in rectal cancer patients // *Strahlenther Onkol.* – 2000. – В.176. – S. 416-421.
4. Trog D, Bank P, Wendt TG et al. Daily amifostine given concomitantly to chemoradiation in head and neck cancer. A pilot study // *Strahlentherapie Oncol.* – 1999. – В. 175. – S.444-449.
5. Васин М.В., Ушаков И.Б., Ковтун В.Ю. Радиопротектор индралин при ранних и поздних проявлениях местных лучевых поражений / *Вопросы онкологии* № 3. Т 62-2016.
6. medside.ru
7. Галстян И.А., Надежина Н.М., Барабанова А.В. и др. Диагностика, лечение местных лучевых поражений и их отдаленных последствий. Федеральные клинические рекомендации ФМБА России 2.6.7. 2015. 61 с.
8. Koteles G.J., Benko I., Nemeth G. Use of thermography in diagnosis of local radiation injuries//*Health Phys.* 1998. - Vol. 74. - P. 264 - 265.
9. Филин С.В., Протасова Т.Г., Надежина Н.М., Лелюк В.Г. Лазерное доплеровское исследование кровообращения мягких тканей, пострадавших с местными лучевыми поражениями для определения объема хирургической помощи//*Методология флоуметрии.* 1999. - С. 81 - 97.
10. Chu J., Sun J., Templeton A., Griem K. Thermal effusivity: A promising imaging biomarker to predict radiation-induced skin injuries//*Health physics.* 2012. - Vol. 103. - P. 204 - 209.

**ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И РАДИОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО
ГЕНИСТЕИНА КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА
ДЛЯ СОПРОВОЖДЕНИЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ**

О.Ю. Стрелова¹, Л.С. Теслов¹, К.В. Волкова¹, Р.А. Тарумов¹, А.Н. Гребенюк^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», ² ООО «Специальная и Медицинская Техника», Санкт-Петербург, Россия

e-mail: olga.strelova@pharminnotech.com

Резюме. По обозначенным в Государственной фармакопее критериям проведена физико-химическая оценка показателей качества отечественного синтетического генистеина как перспективной фармацевтической субстанции для разработки нового лекарственного препарата. По показателям выживаемости облученных мышей изучена эффективность синтетического генистеина в качестве радиомодификатора для сопровождения лучевой терапии. Наиболее выраженный радиозащитный эффект зарегистрирован при введении генистеина в дозе 200 мг/кг за 1 ч до облучения.

Ключевые слова: генистеин, показатели качества, облучение, радиозащитная эффективность.

**EVALUATION OF THE QUALITY AND RADIOPROTECTIVE EFFICIENCY OF
THE PHARMACEUTICAL SUBSTANCE BASED ON SYNTHETIC GENISTINE AS
A PERSPECTIVE MEDICINE FOR SUPPORTING OF RADIATION THERAPY**

O.Yu. Strelova¹, L.S. Teslov¹, K.V. Volkova¹, R.A. Tarumov¹, A.N. Grebenyuk^{1,2}

¹ St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, ² Special & Medical Equipment LLC, St. Petersburg, Russia, e-mail: olga.strelova@pharminnotech.com

Резюме. The physicochemical assessment of the quality indicators of domestic synthetic genistein as a promising pharmaceutical substance for the development of a new medicine was carried out according to the criteria outlined in the State Pharmacopoeia. The effectiveness of synthetic genistein as a radiomodifier to supporting of radiation therapy was studied at survival rates of irradiated mice. The most pronounced radioprotective effect was registered with the introduction of genistein at a dose of 200 mg / kg 1 hour before irradiation.

Key words: genistein, quality indicators, irradiation, radioprotective efficiency.

Одним из приоритетных направлений развития медицины является поиск новых высокоэффективных лекарственных препаратов с широким спектром фармакологического действия и низкой токсичностью. Большой интерес в этом плане представляют вещества природного происхождения, в частности генистеин – природный изофлавоноид, в значительном количестве представленный в растениях семейства *Бобовые (Fabaceae)*. Являясь полифенольным соединением, он обладает выраженной антиоксидантной активностью, что позволяет рассматривать его в качестве радиомодификатора, перспективного для сопровождения лучевой и химиолучевой терапии опухолей [1–5].

Цель исследования: определение показателей качества и радиозащитной эффективности синтетического генистеина как новой фармацевтической субстанции для создания лекарственного препарата для сопровождения лучевой терапии.

Материалы и методы. Использованный в работе генистеин был синтезирован к.х.н. В.Ю. Ковтуном и к.х.н. И.Е. Чикуновым (НПЦ «Фармзащита» ФМБА России). В качестве препарата сравнения использован природный генистеин, выделенный из жмыха семян *soi культурной (Glycine max L. Merr.)* на кафедре фармакогнозии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

Описание фармацевтической субстанции отечественного синтетического генистеина, определение растворимости выполняли в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи XIV издания [6]. Температуру плавления определяли на малогабаритном нагревательном столе *Mikro-Heiztisch «BOETIUS»* с визуальным устройством РНМК 05 по стандартной методике.

Тонкослойно-хроматографическое исследование проводили в следующих условиях: хроматографическая пластинка «*Силуфол-UV-254*» (Avalier, Czechoslovakia); подвижная фаза – хлороформ : 95% спирт (9 : 1), исследовались растворы образцов субстанций и природного генистеина в 95% спирта. Хроматограммы проявляли в УФ-свете 254 нм, а затем обрабатывали 5% спиртовым раствором алюминия хлорида и 1% спиртовым раствором железа(III) хлорида.

Ультрафиолетовый спектр записывали на спектрофотометре *UV/VIS UV-Mini-1240 Shimadzu*. Для определения удельного показателя поглощения приготовили серию растворов с концентрациями синтетического генистеин в интервале 0.001-0.006 мг/мл. На основании полученных данных сделан расчет удельного показателя поглощения генистеина. Инфракрасный спектр природного и синтетического происхождений генистеина снимали в диске с калия бромидом в области частот от 4000 до 500 см⁻¹.

Исследование методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором проводили на газовом хроматографе *Agilent Technologies 7890A* с автоинжектором 7693 и масс-селективным детектором 5975С фирмы «*Hewlett Packard*» с масс-квадрупольным анализатором; регистрация масс-спектров в режиме Scan полного сканирования ионов в интервале масс 42-450 а.е. В связи с тем, что генистеин в данных условиях не летуч, получали его дериваты методом силилирования [7].

Радиозащитную эффективность синтетического генистеина оценивали путем изучения 30-суточной выживаемости белых беспородных мышей, подвергнутых общему относительно равномерному рентгеновскому облучению на установке «РУМ-17» (180 кВ, 10 МА, фильтр 0.5 мм Cu + 1.0 мм Al, направление облучения спина – грудь, кожно-фокусное расстояние 50 см, мощность экспозиционной дозы 38.2 Р/мин).

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами.

Результаты и их обсуждение. В ходе проведенных исследований установлено, что природный генистеин (4',5,7-тригидроксиизофлавоон; 5,7-дигидрокси-3-(4-гидроксифенил)-4H-1-бензопиран-4-он; CAS: 446-72-0) представляет собой порошок светло-желтого цвета, состоящий, при изучении под микроскопом, из призматических кристаллов. Генистеин, полученный синтетическим путем, после кристаллизации из метанола, аналогичен и также представляет собой порошок светло-желтого цвета, состоящий из кристаллов призматической формы. Синтетический генистеин, как и его природный аналог, практически нерастворим в воде, легко растворим в ДМСО, умеренно растворим в 95% спирте, мало растворим в метаноле, очень мало растворим в ацетонитриле, практически нерастворим в хлороформе. Температуры плавления природного и синтетического генистеина находятся в пределах 305-308 °С.

Спектры поглощения природного и синтетического генистеина имеют максимумы поглощения при длине волны 261±2 нм и удельным показателем поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%} = 1369.8 \pm 55$, что может быть в дальнейшем использовано для проведения количественного определения генистеина в лекарственной форме.

Тонкослойно-хроматографическое исследование при детектировании в ультрафиолетовом свете (254 нм) и использовании указанных реактивов показало одинаковые по окраске пятна, которые совпадали по значению R_f (R_f = 0.40).

При исследовании методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором триметилсилильных производных изучаемых веществ на хроматограмме наблюдали один пик вещества со временем удерживания 13.76 мин. В масс-спектрах

как синтетического, так и природного генистеина отмечаются однотипные пики молекулярного иона (триметилсилильного производного) с m/z 486.2, базовый пик 207.0 и осколочные пики ионов 73.0, 228.0, 281.0, 399.1, 471.1. Автоматическая обработка с помощью специализированной библиотеки «NIST08.L» с использованием программы AMDIS показала, что исследуемые масс-спектры с вероятностью не ниже 90% совпали со спектром 5,7,4'-три(триметилсилил)генистеина.

В эксперименте показано, что применение генистеина в дозе 200 мг/кг за 24 ч до, через 1 ч или ежедневно в течение 5 сут после облучения в дозах 7, 8 и 9 Гр значимо не влияло на показатели выживаемости облученных животных, значения которых достоверно не отличались от показателей контрольной группы. В то же время, профилактическое введение генистеина за 1 ч до облучения позволяло защитить часть мышей от лучевой гибели: при облучении в дозе 7 Гр выживаемость мышей, получивших генистеин, статистически значимо увеличилась на 30% ($p < 0.05$), в дозе 8.0 Гр – на 44% ($p < 0.05$) и в дозе 9 Гр – на 37% ($p < 0.05$) соответственно. Расчетное значение ФИД для генистеина в дозе 200 мг/кг при введении за 1 ч до облучения составило 1.23 ± 0.09 . Таким образом, обнаружен радиозащитный эффект синтетического генистеина, который был максимален при применении препарата за 1 ч до облучения.

Заключение. В ходе исследования были определены показатели качества синтетического генистеина: описание, растворимость, подлинность (цветные реакции, УФ спектрофотометрия и ИК спектроскопия) температура плавления, удельный показатель поглощения, а также его хроматографическая подвижность и масс-спектр. Показана радиозащитная эффективность синтетического генистеина, максимальная при его введении до облучения, и возможность создания на его основе лекарственного препарата для сопровождения лучевой терапии опухолей.

Список литературы

1. Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Тарумов Р.А. [и др.]. Оценка антиоксидантных свойств отечественного синтетического генистеина на моделях *in vitro* и *in vivo* // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2013. № 2. С. 83-87.
2. Тарумов Р.А., Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Ковтун В.Ю. Биологические свойства фитоэстрогена генистеина // Медицина экстремальных ситуаций. 2014. № 2. С. 55-68.
3. Weiss J.F., Landauer M.R. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals // Toxicology. 2003. Vol. 189, № 1-2. P. 1-20.
4. Son T.G., Gong E.J., Bae M.J. [et al.]. Protective effect of genistein on radiation-induced intestinal injury in tumor bearing mice // BMC Complementary and Alternative Medicine. 2013. Vol. 13. P. 103. Publ. online 2013 May 14. doi: 10.1186/1472-6882-13-103.
5. Tidke S.A., Mahajankatti A., Devasurmurt Y. [et al.]. Assessment of anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties of isoflavones present in soybean // Research Journal of Phytochemistry. 2018. Vol. 12, № 1. P. 35-42.
6. Государственная Фармакопея РФ. 14 изд. В 4 т. М.: МЗ РФ, 2018. Федеральная электронная медицинская библиотека <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>
7. Стрелова О.Ю., Волкова К.В., Гребенюк А.Н., Теслов Л.С. Оценка показателей качества перспективной фармацевтической субстанции на основе синтетического генистеина // Бутлеровские сообщения. 2016. Т. 48, № 12. С. 94-101.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ НОВЫХ ОСТЕОТРОПНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ, МЕЧЕННЫХ ГАЛЛИЕМ-68

*V.K. Tishchenko¹, V.M. Petriev^{1,2}, A.A. Mikhailovskaya¹, K.A. Kuzenkova¹,
I.N. Zavestovskaya²*

¹ ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, г. Обнинск, Россия, ² Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия,
e-mail: petriev@mrrc.obninsk.ru

Резюме. В работе на интактных крысах *Wistar* изучали биораспределение меченных галлием-68 гидроксидэтилендифосфоновой кислоты (⁶⁸Ga-ОЭДФ), N,N,N',N'-этилендиаминтетракис(метилфосфоновой) кислоты (⁶⁸Ga-ЭДТМФ) и диэтиленetriаминпентакис(метилфосфоновой) кислоты (⁶⁸Ga-ДТПФК). Показано, что ⁶⁸Ga-ЭДТМФ и ⁶⁸Ga-ДТПФК обладали высокой стабильностью *in vivo*, селективно накапливаясь в костной ткани и обеспечивая высокие значения соотношений кость бедра/кровь и кость бедра/мышца. ⁶⁸Ga-ОЭДФ, напротив, характеризовался низкой стабильностью и высоким содержанием радиоактивности в крови. Таким образом, ⁶⁸Ga-ЭДТМФ и ⁶⁸Ga-ДТПФК могут рассматриваться как потенциальные радиотрейсеры для визуализации костной ткани методом позитронной эмиссионной томографии.

Ключевые слова: галлий-68, фосфонаты, остеотропные соединения, позитронная эмиссионная томография.

A RESEARCH STUDY OF BIODISTRIBUTION OF NEW BONE-SEEKING COMPOUNDS BASED ON PHOSPHONIC ACIDS LABELED WITH GALLIUM-68

*V.K. Tishchenko¹, V.M. Petriev^{1,2}, A.A. Mikhailovskaya¹, K.A. Kuzenkova,
I.N. Zavestovskaya²*

¹ National Medical Research Centre of radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, ² National Research Nuclear University MEPHI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia, e-mail: petriev@mrrc.obninsk.ru

Summary. In this work the biodistribution of labeled with gallium-68 hydroxyethylidenediphosphonic acid (⁶⁸Ga-HEDP), N,N,N',N'-ethylenediaminetetrakis(methylene phosphonic) acid (⁶⁸Ga-EDTMP) and diethylenetriaminepentakis(methylenephosphonic) acid (⁶⁸Ga-DTPMP) in intact *Wistar* rats were studied. It was shown that ⁶⁸Ga-EDTMP and ⁶⁸Ga-DTPMP had high *in vivo* stability, accumulating in bone tissue and providing high femur/blood and femur/muscle values. On the contrary, ⁶⁸Ga-HEDP had low stability and high amounts of radioactivity in blood. In conclusion, ⁶⁸Ga-EDTMP and ⁶⁸Ga-DTPMP can be considered as potential radiotracers for bone tissue imaging by positron emission tomography.

Key words: gallium-68, phosphonates, bone-seeking compounds, positron emission tomography.

Развитие многих онкологических заболеваний сопровождается метастатическим поражением скелета. Наиболее чувствительным методом диагностики костных метастазов является позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) с 2-¹⁸F-фтор-2-дезоксид-Д-глюкозой и ¹⁸F-фторидом натрия. Для синтеза этих соединений необходимо наличие дорогостоящего высокотехнологичного оборудования – медицинского циклотрона, который должен находиться либо непосредственно в клинике, либо на доступном для быстрой транспортировки расстоянии ввиду короткого времени жизни изотопа ¹⁸F (T_{1/2} = 110 мин).

Альтернативным радионуклидом для проведения ПЭТ исследований является галлий-68 (^{68}Ga). Его ядерно-физические свойства ($T_{1/2} = 68$ мин, $\beta^+ = 89\%$, $E^+_{\beta\text{max}} = 1,9$ МэВ) и возможность получения в ионной форме из коммерчески доступного генератора $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ позволят использовать ^{68}Ga для создания высокоспецифичных РФП для диагностики костных метастазов и снизить стоимость ПЭТ-исследований.

Цель исследования: изучить биораспределение меченных ^{68}Ga новых остеотропных соединений на основе N,N,N',N'-этилендиаминтетраakis(метилфосфоновой) кислоты (^{68}Ga -ЭДТМФ), диэтилентриаминпентаkis(метилфосфоновой) кислоты (^{68}Ga -ДТПФК) и гидроксидэтилендифосфоновой кислоты (^{68}Ga -ОЭДФ) в организме интактных крыс *Wistar*.

Материалы и методы. Для получения меченых препаратов использовали генератор $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ производства ЗАО «Циклотрон», ЭДТМФ производства фирмы Sigma Aldrich (Великобритания), ДТПФК в виде 50% раствора в соляной кислоте производства фирмы Fluka (Германия) и ОЭДФ – фармакопейное наименование Ксидифон в виде 20 % раствора производства ФГУП «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А.Семашко.

Изучение биораспределения полученных соединений проводили на крысах *Wistar*, самках, с массой тела 140-160 г. Животные были поделены на четыре равные группы (по 16 крыс в каждой). Животным первой группы внутривенно (в хвостовую вену) однократно вводили ^{68}Ga -ЭДТМФ с активностью 0,37 МБк в объеме 0,1 мл. Второй и третьей группам крыс внутривенно вводили соответственно ^{68}Ga -ДТПФК и ^{68}Ga -ОЭДФ с активностью 0,37 МБк в объеме 0,1 мл. Четвертая группа животных служила контролем: им внутривенно вводили $^{68}\text{GaCl}_3$ с активностью 0,37 МБк в объеме 0,1 мл на крысу. Через 5 мин, 1, 2 и 3 ч после введения по 4 животных на каждый срок подвергали эвтаназии путем декапитации (под наркозом), выделяли пробы органов и тканей, помещали их в пластиковые пробирки, взвешивали и проводили радиометрию с помощью автоматического гамма-счетчика. По данным радиометрии на каждый срок наблюдения рассчитывали количество радиоактивности на 1 г органа или ткани в % от введенной дозы (%/г). Результаты радиометрии обрабатывали с вычислением средней величины и стандартной ошибки средней величины ($M \pm m$). Сравнение уровней накопления радиоактивности в группах по сравнению с контролем проводилось с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. На протяжении всего периода наблюдения наибольший уровень активности наблюдался в костной ткани. При этом содержание ^{68}Ga -ЭДТМФ в кости бедра достигало 1,61 %/г, ^{68}Ga -ДТПФК – 1,45 %/г, тогда как для ^{68}Ga -ОЭДФ эта величина не превышала 0,91 %/г, что практически не отличалось от максимального уровня $^{68}\text{GaCl}_3$ – 0,83 %/г.

Соотношения активностей в костной ткани к крови и мышечной ткани для ^{68}Ga -ЭДТМФ и ^{68}Ga -ДТПФК были выше по сравнению с ^{68}Ga -ОЭДФ и $^{68}\text{GaCl}_3$, возрастая пиковых значений к концу исследования. Так, численные соотношения кость бедра/кровь для ^{68}Ga -ЭДТМФ и ^{68}Ga -ДТПФК достигали $2,50 \pm 0,37$ и $3,36 \pm 0,72$ соответственно, тогда как для ^{68}Ga -ОЭДФ и $^{68}\text{GaCl}_3$ эти величины были практически одинаковыми и не превышали 1. Соотношения кость бедра/мышца для ^{68}Ga -ЭДТМФ, ^{68}Ga -ДТПФК, ^{68}Ga -ОЭДФ и $^{68}\text{GaCl}_3$ были больше 1 во все сроки эксперимента, однако ^{68}Ga -ЭДТМФ и ^{68}Ga -ДТПФК характеризовались более высокими значениями по сравнению с $^{68}\text{GaCl}_3$ ($p < 0,05$), что предполагает возможность их применения для визуализации костной ткани методом ПЭТ.

^{68}Ga -ЭДТМФ и ^{68}Ga -ДТПФК, обладая высокой стабильностью *in vivo*, быстро выводились из крови и практически не накапливались во внутренних органах и тканях, тогда как $^{68}\text{GaCl}_3$ и ^{68}Ga -ОЭДФ долгое время удерживались в кровотоке за счет связывания $^{68}\text{Ga}^{3+}$ с белками плазмы крови. Во внутренних органах уровень активности ^{68}Ga -ОЭДФ и $^{68}\text{GaCl}_3$ также был выше по сравнению с ^{68}Ga -ЭДТМФ и ^{68}Ga -ДТПФК.

Выводы. При изучении биораспределения ^{68}Ga -ЭДТМФ, ^{68}Ga -ДТПФК и ^{68}Ga -ОЭДФ было выявлено быстрое и селективное накопление ^{68}Ga -ЭДТМФ, ^{68}Ga -ДТПФК в костной ткани и минимальное содержание во внутренних органах и тканях. Стабильность ^{68}Ga -ОЭДФ *in vivo*, напротив, невысока, из-за чего большая часть активности удерживается в крови. Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать ^{68}Ga -ЭДТМФ и ^{68}Ga -ДТПФК в качестве потенциального радиотрейсера для визуализации костной ткани методом ПЭТ.

Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 075-02-2018-097). Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57518X0174

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРИСТЫХ КРЕМНИЕВЫХ НАНОЧАСТИЦ, МЕЧЕННЫХ РЕНИЕМ-188, В ОРГАНИЗМЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ
В.К. Тищенко¹, В.М. Петриев^{1,2}, А.А. Михайловская¹, А.В. Кабашин², Е.Д. Степченкова¹, И.Н. Завестовская²

¹ ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, г. Обнинск, Россия, ² Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия,
e-mail: petriev@mrrc.obninsk.ru

Резюме. Изучено биораспределение пористых кремниевых наночастиц, меченных рением-188 (¹⁸⁸Re-КНЧ), у интактных крыс и крыс с экспериментальной моделью холангиомы РС-1 при внутривенном введении. Повышенное накопление активности отмечалось в легких, печени и щитовидной железе. Максимальное содержание активности в опухоли составило 0,32 %/г. Таким образом, ¹⁸⁸Re-КНЧ можно рассматривать как перспективное соединение для радионуклидной терапии опухолей.

Ключевые слова: наночастицы, пористый кремний, рений-188, радионуклидная терапия, опухоль.

BIODISTRIBUTION OF POROUS SILICON NANOPARTICLES LABELED WITH RHENIUM-188 IN EXPERIMENTAL ANIMALS

V.K. Tishchenko¹, V.M. Petriev^{1,2}, A.A. Mikhailovskaya¹, A.V. Kabashin², E.D. Stepchenkova, I.N. Zavestovskaya²

¹ National Medical Research Centre of radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia, ² National Research Nuclear University MPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia, e-mail: petriev@mrrc.obninsk.ru

Summary. The biodistribution of porous silicon nanoparticles labeled with rhenium-188 (¹⁸⁸Re-SiNPs) after intravenous administration in intact rats and rats with transplanted cholangioma RS-1 was studied. Increased uptake of activity was observed in lungs, liver and thyroid gland. The highest amount of activity in tumor was 0.32 %ID/g. In conclusion, ¹⁸⁸Re-SiNPs can be a promising agent for radionuclide therapy of tumors.

Key words: nanoparticles, porous silicon, rhenium-188, radionuclide therapy, tumor.

Радионуклидная терапия – один из наиболее перспективных методов лечения онкологических заболеваний. Принципиально новыми носителями радионуклидов могут стать наночастицы пористого кремния. Кремниевые наночастицы (КНЧ) обладают высокой механической, термической и химической прочностью, значительной площадью поверхности (> 300 м²/г), большим объемом пор, что позволяет варьировать степень их сорбционной емкости, а также характеризуются отсутствием токсических и иммуногенных свойств.

Оптимальным радионуклидом для терапевтических целей благодаря своим ядерно-физическим характеристикам является ¹⁸⁸Re (T_{1/2} = 17 ч, E_β = 0,78 МэВ, E_{βmax} = 2,12 МэВ, E_γ = 0,155 МэВ). ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re-генераторы имеют длительный срок годности (4-6 месяцев), что позволяет получать ¹⁸⁸Re с требуемой объемной активностью непосредственно в клиниках путем элюирования физиологическим раствором.

Цель исследования: оценка биораспределения пористых КНЧ, меченных ¹⁸⁸Re (¹⁸⁸Re-КНЧ) в организме интактных лабораторных животных и животных с экспериментальной моделью злокачественной опухоли.

Материалы и методы. Для проведения исследований использовали интактных крыс *Wistar* и крыс с имплантированной подкожно холангиомой РС-1. Животным

внутривенно однократно вводили 0,37 МБк ^{188}Re -КНЧ в объеме 0,1 мл. Крысам с холангиомой РС-1 введение ^{188}Re -КНЧ проводили через 8 суток после имплантации опухолевых клеток, когда объем опухоли достигал 0,7–0,8 см³. Через 5 мин, 1, 3, 24, 48 и 72 ч после введения по 4 животных на каждый срок подвергали эвтаназии путем декапитации, выделяли образцы органов и тканей, взвешивали и оценивали интенсивность ионизирующего излучения радиометрическим методом на автоматическом гамма-счетчике. Накопление активности выражали в процентах от введенной дозы на 1 г ткани (%/г).

Результаты. При однократном внутривенном введении ^{188}Re -КНЧ интактным крысам *Wistar* большая часть активности (до 8,71 %/г) накапливается в легких. Концентрация активности в крови не превышает 0,91 %/г. У крыс с холангиомой РС-1 в опухолевой ткани накапливалось не более 0,32 %/г радиоактивности, снижаясь к концу исследования до 0,14 %/г. Максимальный уровень активности препарата в крови составил 1,95 %/г. Повышенное содержание радиоактивности (до 5,69 %/г) обнаруживалось в щитовидной железе, а также печени (до 2,57 %/г) и легких (до 1,86 %/г). В остальных органах и тканях обеих групп животных концентрация активности не превышала 1 %/г.

Выводы. Полученные результаты позволяют рассматривать КНЧ в качестве перспективных носителей радиоактивной метки с целью противоопухолевой терапии.

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ СИНЕРГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ФИЗИЧЕСКИХ АГЕНТОВ С ХИМИЧЕСКИМИ ВЕЩЕСТВАМИ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

М.С. Толкаева¹, Е.С. Евстратова²

¹МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 249036, Обнинск, Россия, e-mail: marya.tolkaeva@yandex.ru, ²ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

Резюме. В проведённых опытах продемонстрирована целесообразность внедрения в лучевую терапию синергического взаимодействия ионизирующего излучения или гипертермии совместно с химическими веществами в целях уменьшения дозы или концентрации, применяемых агентов.

Ключевые слова: синергическое взаимодействие, ионизирующее излучение, гипертермия, тяжёлые металлы.

POSSIBILITY OF SYNERGICAL EFFECT APPLICATION IN COMBINED INTERACTION OF PHYSICAL AGENTS WITH CHEMICALS IN ANTITUMOR THERAPY

M.S. Tolkaeva¹, E.S. Evstratova²

¹A. Tsyb MRRC, Obninsk, Russia, e-mail: marya.tolkaeva@yandex.ru, ²FSBI "NMIC of radiology" of the Ministry of Health of Russia, Obninsk, Russia

Summary. The experiments have demonstrated the feasibility of introducing into the therapy a synergistic interaction of ionizing radiation or hyperthermia with chemicals to reduce the dose or concentration of the agents used.

Keywords: synergistic interaction, ionizing radiation, hyperthermia, heavy metals, yeast cells.

Актуальность. Совместное применение лучевой терапии или гипертермии с различными химическими препаратами, содержащими тяжёлые металлы, приводит к существенному увеличению общей эффективности инактивации клеток, а также позволяет одновременно снизить применяемые дозы и концентрации для окружающих тканей и всего организма в целом. В существующей практике комбинированное использование различных агентов связано с усилением поражаемости опухолевых клеток вследствие аддитивного сложения эффектов от двух терапевтических процедур. Однако такое применение не позволяет добиться максимального биологического эффекта, который возможен при синергическом взаимодействии, которое, кроме того, обеспечивает максимальное снижение дозы используемого агента. Изучение синергических взаимодействий различных физических факторов с солями тяжёлых металлов, которые являются перспективными в практическом применении подходов лучевой терапии, представляется актуальной проблемой современной радиобиологии.

Материалы и методы. В проведённых экспериментах было изучено проявление синергического взаимодействия ионизирующего излучения (γ -кванты ^{60}Co , мощность дозы 10.8 Гр/мин) или гипертермии (48, 50, 52, 53, 54, 55°C) с растворами PbI_2 различной концентрации (0,5, 1, 1,5, 2,5 и 5 мг/мл) на выживаемость диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800). Суспензию клеток помещали в хорошо прогретые растворы соли свинца или непосредственно перед облучением ионизирующим излучением и выдерживали необходимое время, после чего высевали на твёрдую питательную среду. Для оценки результатов использовали выживаемость клеток, регистрируемую по способности облучённых клеток

образовывать видимые глазом макроколонии. Количественно выживаемость оценивали отношением числа колоний, образованных клетками, подвергшихся действию применяемых агентов, к числу колоний, сформированных в контроле. На этом основании строили кривые зависимости выживаемости от дозы или продолжительности применения воздействующих агентов и рассчитывали коэффициент синергического усиления [1].

Результаты. Синергизм при комбинированном действии ионизирующего излучения с растворами PbI_2 наблюдается в пределах значений концентрации от 0,5 до 2,5 мг/мл, максимальное синергическое взаимодействие обеспечивается при концентрации раствора PbI_2 1,5 мг/мл, коэффициент синергического усиления равняется 5. Для концентрации 1 мг/мл максимальный коэффициент синергического усиления составляет 1,4 и достигается при температуре 52°C, а для концентрации 2,5 мг/мл он составляет 4,3 и достигается при температуре 53°C.

Обсуждения. Полученные в данном исследовании результаты могут быть использованы для комбинированного применения физических агентов (гипертермия, ионизирующее излучение) в сочетании с химическими агентами, содержащими тяжелые металлы, в медицинской радиологии и позволяют продемонстрировать возможные пути снижения доз и концентраций используемых агентов для достижения максимального эффекта.

Выводы. Благодаря проведенным исследованиям для растворов PbI_2 , используемых в комбинации с физическими агентами, была подтверждена универсальность ранее выявленных закономерностей синергического взаимодействия [2], а именно:

1. Синергическое взаимодействие наблюдается не при любых соотношениях воздействующих факторов, а лишь в определенном диапазоне доз.
2. При оптимальном соотношении агентов наблюдается максимальное синергическое взаимодействие.
3. При снижении интенсивности одного агента необходимо уменьшать интенсивность или концентрацию другого для обеспечения максимального синергического эффекта.

Список литературы

1. Петин В.Г., Жураковская Г.П., Комарова Л.Н. Радиобиологические основы синергических взаимодействий в биосфере. М.: ГЕОС, 2012. 219 с.
2. Евстратова Е.С., Петин В.Г. Биофизическая интерпретация зависимости синергизма от интенсивности применяемых агентов // Биофизика. 2018. Т. 63, №6. С. 1186–1194.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НИЗКИХ ДОЗ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА.

Усупжанова Д. Ю.¹, Астрелина Т.А.¹, Никитина В.А.¹, Сучкова Ю.Б.¹, Кобзева И.В.¹, Брунчуков В.А.¹, Расторгуева А.А.¹, Брумберг В.А.¹, Бушманов А.Ю.¹, Самойлов А.С.¹

¹ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России (г. Москва), email: usupzhanova94@mail.ru

Резюме. Исследование эффектов, оказываемых низкими дозами рентгеновского излучения на жизнедеятельность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека, в сравнении с эффектами сублетальной дозы 1000 мГр. Показан так называемый «эффект свидетеля» при контакте клеток с кондиционными средами от МСК, получивших дозу облучения. Данный эффект демонстрирует как угнетающее, так и стимулирующее действие на пролиферативную активность МСК в зависимости от полученной клетками дозы облучения. Предполагается, что низкие дозы рентгеновского излучения оказывают эффект на жизнедеятельность клеток посредством изменения состава цитокинового профиля, однако этот эффект не всегда угнетающий.

Ключевые слова: клетки человека, низкие дозы, рентгеновское излучение, эффекты ионизирующего излучения, мезенхимальные стволовые клетки.

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF LOW DOSES OF X-RAY RADIATION ON HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS.

Usupzhanova D. Yu.¹, Astrelina T.A.¹, Nikitina V.A.¹, Suchkova Yu.B.¹, Kobzeva I.V.¹, Brunchukov V.A.¹, Rastorgueva A.A.¹, Brumberg V. A.¹, Bushmanov A.Yu.¹, Samoilov A.S.¹

State Research Center Burnasyan Federal Medical Biophysical Center
FMBA of Russia (Moscow), e-mail: usupzhanova94@mail.ru

Summary. Study of the effects of low doses of X-ray radiation on the vital activity of human mesenchymal stem cells (MSCs) in comparison with the effects of dose of 1000 mGy. The “bystander effect” is shown after contact of cells with conditioned media from MSCs that received a radiation dose. This effect demonstrates both an inhibitory and stimulating effect on the proliferative activity of MSCs in depending on the radiation received dose. It is assumed that low doses of X-ray radiation have an effect on the vital functions of cells by changing the composition of the cytokine profile, but this effect is not always depressing.

Key words: human cells, low doses, x-ray radiation, effects of ionizing radiation, mesenchymal stem cells.

Введение. На протяжении всей жизни человек постоянно подвергается воздействию низких доз радиационного излучения, как фонового, так и в рамках медицинской диагностики и лечения, от свалок радиоактивных отходов, в ходе профессиональной деятельности и во время авиаперелетов. Однако, не смотря на постоянно увеличивающиеся количество источников низкодозового излучения, на сегодняшний день остаётся не изученным воздействие низких доз радиации на аспекты жизнедеятельности человека, в частности, на стволовые клетки, являющиеся неотъемлемой и важной частью организма – регенеративным резервом, нарушения процессов жизнедеятельности которого напрямую влияют на организм в целом [1]. Таким образом, представленное исследование является актуальным.

Цель: оценка влияния низких доз рентгеновского излучения на мезенхимальные стволовые клетки (МСК) человека из различных источников для оценки отдаленных последствий *in vitro*.

Материалы и методы: в работе были использованы МСК слизистой ткани десны, лимба роговицы глаза и плаценты человека. Культивирование МСК осуществилось по стандартной методике. МСК подвергали воздействию рентгеновского излучения мощностью 100 кВ 40 мГр/мин (0,8 мА, 1,5 мм А1-фильтр) с использованием установки РУСТ-М1 (Россия). Облучение проводили в дозах 50, 80, 100, 250 и 1000 мГр, далее на ранних и поздних этапах культивирования оценивали влияние рентгеновского излучения на биологические характеристики МСК: уровень поверхностных антигенов методом проточной цитофлуориметрии (BD FACS CantoII), а также пролиферативную активность (ПА) с помощью прибора XCelligence (ACEA Biosciences, Inc.).

Результаты: на ранних и поздних этапах культивирования было обнаружено изменение уровней поверхностных антигенов CD73 (экто-5'-нуклеотидаза) и CD105 (эндоглин), однако эти изменения были различными для МСК из различных типов тканей, а эффекты дозы 80 мГр отличались от эффектов доз 250 и 1000 мГр, линейная зависимость доза-эффект в большинстве случаев не наблюдалась. Наибольшая стабильность уровней поверхностных антигенов после облучения была отмечена для МСК слизистой ткани десны, на основании этого данный тип МСК был выбран для дальнейших исследований.

Было показано, что при длительном культивировании пролиферативная активность МСК слизистой ткани десны, облученных в дозе 50 мГр, сравнима с группой контроля, в то время как дозы 100 и 250 мГр демонстрировали ее снижение. Необлученные МСК демонстрировали существенное снижение ПА при культивировании в кондиционной среде с клеток, получивших дозу облучения 1000 мГр, а повышение ПА при культивировании в кондиционной среде клеток, получивших дозы облучения 50, 100 и 250 мГр. Также была отмечена «адаптивность» клеток, предварительно облученных в дозе 250 мГр, к угнетающему пролиферацию действию кондиционной среды клеток, получивших дозу облучения 1000 мГр.

Обсуждение: Существующее сегодня противоречие результатов исследований эффектов низких доз ионизирующего излучения на живые системы не дает ответа на вопрос, укладываются ли эффекты низких доз в пороговую или беспороговую концепции воздействия радиации на организм.

В представленном исследовании оценка эффектов низких доз радиации сфокусирована на «эффекте свидетеля» [2], отмеченного при добавлении кондиционных сред от облученных клеток к предварительно облученным и необлученным МСК. Угнетающее действие кондиционных сред от клеток, получивших сублетальную дозу облучения, было отмечено так же, как и в работах Мазерсил и соавт., предполагающих, что данный эффект позитивен и направлен на элиминирование уже поврежденных клеток из популяции [3]. В сравнении с усиливающим ПА эффектом кондиционных сред от клеток, получивших низкие дозы облучения, можно определенно сказать, что «эффект свидетеля» для низких и высоких доз различен, а их биологический смысл требует дополнительного изучения.

В результате внесения кондиционных сред клеток, облученных дозой 1000 мГр, к предварительно облученным МСК было показано явление адаптивного ответа. Клетки, получившие дозу 250 мГр и подвергнувшие влиянию кондиционной среды, показали более высокие уровни ПА в сравнении с другими группами. Полученный результат ставит под сомнение предположение, сделанное Мазерсил и соавт., а также приводит к заключению, что эффект низких доз может быть позитивным.

Таким образом, результаты исследования в большей мере укладываются в рамках пороговой нелинейной концепции, согласно которой эффект не

пропорционален полученной дозе облучения. В продолжении исследования будет изучен цитокиновый профиль кондиционных сред облученных МСК.

Выводы: было показано, что низкие дозы радиационного облучения оказывают влияние на мезенхимальные стволовые клетки человека. Установлено, что эффекты одних и тех же доз могут быть различными для МСК из различных типов тканей, а также эффекты доз 50,80,100 и 250 мГр отличаются от эффектов дозы 1000мГр. Кондиционные среды облученных клеток оказывают воздействие как на облученные, так и не облученные МСК («эффект свидетеля»). В случае культивирования в кондиционных средах предварительно облученных МСК отмечен адаптивный ответ.

Список литературы:

1. Squillaro T, Galano G, De Rosa R, Peluso G, Galderisi U. Concise Review: The Effect of LowDose Ionizing Radiation on Stem Cell Biology:A Contribution to Radiation Risk. Stem Cells. 2018 Aug; 36(8):1146-1153.
2. Bonner WM. Low - dose radiation: thresholds, bystander effects, and adaptive responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:4973 - 4975.
3. Carmel Mothersill et al. Individual variation in the production of a `bystander signal' following irradiation of primary cultures of normal human urothelium. Carcinogenesis. 2001 Sep, 22 (9):1465–1471.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РЕГЛАМЕНТИРОВАННОЙ ДОЗЫ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ГОЛОВНОЙ МОЗГ

И.Б. Ушаков¹, В.П. Федоров², А.Н. Асташова³

¹Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия; ²ФГБВОУ ВО «Воронежский государственный институт физической культуры», Воронеж, Россия; ³Военный учебно-научный центр военно-воздушных сил «Военно-воздушная академия имени профессора Н.Е. Жуковского И Ю.А. Гагарина» Воронеж, Россия, E-mail: fedor.vp@mail.ru

Резюме. В экспериментах на крысах, подвергшихся гамма облучению в дозах, сопоставимых с полученными летным составом при ликвидации последствий чернобыльской радиационной аварии на всем пострациационном периоде не выявлены значимые органические изменения в различных отделах головного мозга. Сделано заключение, что при оценке последствий радиационного воздействия надо учитывать исходное состояние здоровья ликвидаторов и весь комплекс сопутствующих неблагоприятных факторов, а не только дозу внешнего радиационного воздействия.

Ключевые слова: Радиационная авария, головной мозг, нейроморфологические изменения, здоровье и психоневрологический статус ликвидаторов.

EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF THE EFFECT OF REGULATED DOSE OF IONIZING RADIATION ON THE BRAIN

V.P. Fyodorov¹, I.B. Ushakov², A.N. Astashova³

¹Russian State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia; ²Voronezh State Institute of Physical Culture, Voronezh, Russia; ³Military educational scientific center air force "air force Academy named after Professor N. E. Zhukovsky And Y. A. Gagarin", Voronezh, Russia. E-mail: fedor.vp@mail.ru

Summary. In experiments on rats subjected to gamma irradiation at doses comparable with that obtained flight crews in the aftermath of the Chernobyl radiation accident at all postradiational period revealed no significant organic changes in various parts of the brain. It is concluded that in assessing the effects of radiation exposure it is necessary to take into account the initial state of health of the liquidators and the whole complex of related adverse factors, not only the dose of external radiation exposure.

Key words: Radiation accident, brain, neuromorphological changes, health and mental status of the liquidators.

Установлено, что психические и неврологические нарушения у лиц, принимавших участие в ликвидации последствий радиационной аварии на ЧАЭС, занимают значительное место в структуре их заболеваемости [1, 2, 3, 4]. При этом единого мнения о патогенезе заболеваний нервной системы у исследователей нет и не всегда возможно отличить истинную патологию от проявлений радиофобии, психоэмоционального стресса, ложных рентных установок, а также возрастных изменений [2, 4]. Так как состояние нервной системы при ионизирующем облучении у человека в принципе не подлежит изучению, то выявить ее вклад в нарушение здоровья, определить наиболее радиочувствительные структуры и их доза-временные зависимости на всем протяжении жизни возможно только в экспериментах на животных, когда можно исключить посторонние влияния, оставив лишь радиационный фактор и использовать методики неприемлемые для человека [1, 2].

Целью исследования явилось выявление в радиобиологическом эксперименте

нейроморфологических коррелят нарушения психоневрологического статуса у летного состава, участвующего в ликвидации последствий Чернобыльской радиационной аварии и получивших облучение в регламентированных дозах.

Экспериментальное исследование церебральных эффектов при радиационном воздействии в регламентированных дозах выполнено на 270 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 210 ± 10 г, в возрасте 4 мес., что соответствовало 27 – 28 годам возраста вертолетчиков-ликвидаторов, облученными γ -квантами ^{60}Co в дозе 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 Гр/ч. Для человека это соответствовало дозам от 0,05 до 0,5 Гр. Для летчиков, с учетом профессиональных вредностей, допустимая доза составила 0,25 Гр. Коэффициент экстраполяции с крыс на человека 2, следовательно, 0,25 Гр для человека соответствует примерно 0,5 Гр для крыс. Материал забирали через 1 сутки (время, соответствующее возможной первичной реакции на облучение), 6 (возраст пребывания вертолетчика на военной службе 38 – 40 лет), 12 (предельный возраст для военнослужащих 45 – 50 лет), 18 и 24 (пожилой и старческий возраст) месяца пострадиационного периода, т.е. исследование проведено на полную продолжительность жизни. Каждой группе соответствовал адекватный возрастной контроль. Протокол эксперимента составлен в соответствии с принципами биоэтики и правилами лабораторной практики (Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003). После стандартных гистологических процедур для исследования взяты нейроны различных отделов головного мозга. При анализе основное внимание уделялось таким радиационным мишеням как белок и нуклеиновые кислоты. Оценивалась также и структурно-функциональная перестройка нейронов по тинкториальным и морфометрическим показателям [5]. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакетов программ Statistika 6.1, MS Excel 2007 и Math Cad 14 с использованием параметрических критериев, математическим моделированием, определением прогноза их развития и последующей экстраполяцией на человека.

Проведенные нейроморфологические исследования на полную продолжительность жизни животных показали, что нервная система обладает высокой чувствительностью к радиационному фактору. При этом изменения тинкториальных свойств нейронов неспецифичны, протекают волнообразно, не имеют доза-временной зависимости и преобладают пограничные изменения, отражающие различные варианты физиологической активности нейронов. Такие изменения обратимы и в определенных условиях на их основе могут возникать различные формы альтеративных или адаптационных изменений. Все виды изменений встречаются как в контрольных, так и экспериментальных группах, отличаясь лишь процентным соотношением. Через сутки после облучения нейроны не зависимо от дозы облучения уменьшались в размерах, а через 6 мес. размеры клеток практически не отличались от возрастного контроля. Исключение составила группа животных, облученных в дозе 0,2 Гр. Через 18 мес. наблюдения размеры клеток при дозах 0,2 и 0,5 Гр нормализовались и оставались на этом уровне до конца наблюдения. При дозах 0,1 и 1,0 Гр размер нейронов снижался как по отношению к контролю, так и другим экспериментальным группам ($p < 0,05$). Площадь цитоплазмы нейронов не зависимо от дозы облучения в пострадиационном периоде была меньше контроля. Размеры ядер нейронов имели тенденцию к снижению, а при дозе 1 Гр оно было достоверным. Через 6 мес. размер ядер во всех экспериментальных группах был снижен и оставался на этом уровне и через 12 мес. наблюдения, после чего имел тенденцию к нормализации. Исключение составила группа животных, облученных в дозе 0,1 Гр в которой размер ядер, нормализовался уже через 12, а через 18 мес. снижался и повышался к концу эксперимента. Размер ядрышек нейронов через сутки после облучения достоверно увеличивался (кроме дозы 0,1 Гр). Через 6 мес. ядрышки уменьшались в размере (кроме дозы 0,5 Гр), после чего

имели тенденцию к набуханию и при дозах 0,1 и 0,2 Гр размеры ядрышек соответствовали возрастному контролю. Через 18 мес. размер ядрышек менялся не однонаправленно. При 0,1 и 0,2 Гр он соответствовал контролю, при 0,5 Гр достоверно возрастал, а при 1,0 Гр – снижался. Ядерно-цитоплазматический через 18 мес. отличался от контроля при дозах 0,1 и 1,0 Гр, к концу наблюдения соответствовал контролю при дозе 0,5 Гр, а при других дозах превышал его. Ядрышко-ядерный индекс через 12 мес. соответствовал контролю, а к концу жизни при 0,1 и 0,2 Гр соответствовал контролю, при 0,5 Гр возрастал, а при 1,0 Гр – снижался. Математическая модель динамики нейроморфологических показателей в зависимости от дозы облучения и времени пострadiационного периода представляли в виде уравнения регрессии: $ZП = a_0 + a_1x + a_2y + a_3xy + a_4x^2 + a_5y^2 + a_6x^3 + a_7y^3$, где ЗП – зависимый показатель, x – доза облучения; y – время, после облучения; xy , x^2 , y^2 , x^3 , y^3 – взаимные влияния параметров x , y и нелинейное влияние каждого из этих параметров. Из полученных уравнений регрессии следует, что динамика изменений показателей нейронов имеет нелинейный характер с умеренным или слабым коэффициентом корреляции с исследуемыми аргументами. Изменения касаются части структур и не затрагивают нейронную популяцию в целом. Вместе с тем характер морфологических изменений, возникающих в головном мозге, показывает, что изучаемые дозы ионизирующего излучения приводят в ряде случаев к разнонаправленным эффектам, снижая одни показатели и повышая другие. Это свидетельствует о определенной нестабильности структурно-функциональной организации нейронов, функциональной напряженности и риске возникновения нарушений функционирования нервной системы особенно на фоне других вредных и опасных факторов.

Таким образом выявленные изменения в нейронах головного мозга не являются, видимо, ведущей причиной нарушений психоневрологического статуса ликвидаторов радиационной аварии на ЧАЭС. Наряду с психоэмоциональными факторами, необходимо учитывать исходное состояние здоровья ликвидаторов, инкорпорирование долгоживущих радионуклидов и весь комплекс неблагоприятных факторов радиационной аварии, а не только дозу внешнего облучения. Особого внимания требует учет влияния инкорпорированных радионуклидов, так как в первые ликвидаторы практически не имели средств защиты [6].

Список литературы

1. Гундарова О.П., Федоров В.П., Зуев В.Г. Оценка психоневрологического статуса ликвидаторов радиационных аварий. Воронеж: Научная книга, 2012. 232 с.
2. Ушаков И.Б., Федоров В.П. Малые радиационные воздействия и мозг Воронеж: Научная книга, 2015. 536 с.
3. Федоров В.П., Ушаков И.Б., Федоров Н.В. Церебральные эффекты у ликвидаторов Чернобыльской аварии. Саарбрюккен: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2016. 390 с.
4. Ушаков И.Б., Федоров В.П. Воздействие факторов Чернобыльской аварии на психоневрологический статус ликвидаторов-вертолетчиков // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2018. Т. 63. № 4. С. 22–32.
5. Федоров В.П., Петров А.В., Степанян Н.А. Экологическая нейроморфология. Классификация типовых форм морфологической изменчивости ЦНС при действии антропогенных факторов // Журнал теоретической и практической медицины. 2003. № 1. С. 62–66.
6. Мастрюков А.А., Федоров В.П. Ядерная катастрофа века. Воронеж: Научная книга, 2016. 404 с.

ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ОДНОКРАТНОМ И ФРАКЦИОНИРОВАННОМ РАДИАЦИОННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

В.П. Федоров¹, О.П. Гундарова², Н.В. Сгибнева³

¹ФГБВОУ ВО «Воронежский государственный институт физической культуры», Воронеж, Россия; ²ФГБВОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», Воронеж, Россия; ³ФГБВОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет», Нижний Новгород, Россия. E-mail: fedor.vp@mail.ru

Резюме. В эксперименте на крысах, подвергшихся гамма облучению однократно и фракционированно (равными порциями в течении 5 дней) в суммарных дозах 0,5 Гр показано, что несмотря на ряд особенностей динамики нейроморфологических показателей данные режимы облучения не вызывают в функционально различных слоях лобной коры значимых альтеративных изменений.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, головной мозг, нейроны лобной коры, нейроморфологические изменения.

CHANGES IN NEURONS OF THE CEREBRAL CORTEX WITH A SINGLE AND FRACTIONATED RADIATION EXPOSURE

V.P. Fyodorov¹, O.P. Gundarova², N. V. Sgibneva³

¹Voronezh State Institute of Physical Culture, Voronezh, Russia; ²Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia; ³Privolzhsky Research Medical University, Nigni Novgorod, Russia. E-mail: fedor.vp@mail.ru

Summary. In the experiment on rats subjected to gamma irradiation and once fraksionirovanie (in equal portions for 5 days) in cumulative doses of 0.5 G, it is shown that despite several specific features of dynamics neuromorphological indicators, exposure modes do not cause the functionally different layers of the frontal cortex of important alterative changes.

Key words: ionizing radiation, brain, neurons of the frontal cortex, neuromorphological changes.

Оценка реакции нервной системы на однократное и пролонгированное радиационное воздействие в одной и той же суммарной дозе имеет не только теоретическое, но и практическое значение. Между тем сравнительная оценка структурно функциональной перестройке нейронов при этих режимах облучения остается практически не изученной [1, 2]. В связи с этим целью работы явилось сравнение нейроморфологических изменений в коре больших полушарий головного мозга при однократном и фракционированном облучении в суммарной дозе 0,5 Гр.

Эксперимент с соблюдением правил биоэтики проведен на 180 белых беспородных крысах-самцах в возрасте 4 мес. к началу эксперимента, облученных γ -квантами ^{60}Co с энергией 1,2 МэВ однократно и фракционировано (равномерными порциями в течении 5 дней) в суммарных дозах 0,5 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 Гр/ч. Объектом исследования служила кора лобной доли больших полушарий головного мозга и в частности ее функционально различные III (малые пирамидные нейроны) и V (большие пирамидные нейроны) слои. Материал забирали в первые часы и сутки (1, 3, 7, 14), 1, 3, 6, 12, 18 и 24 мес. пострадиационного периода. Каждой группе соответствовал адекватный возрастной контроль. После стандартных гистологических процедур оценивали структурно-функциональную перестройку нейронов по тинкториальным и морфометрическим показателям, а также состояние ферментативных систем, нейроглии и микроциркуляторного русла. Большое внимание

уделялось таким радиационным мишеням как белок и нуклеиновые кислоты. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакетов программ Statistika 6.1, MS Excel 2007 и Math Cad 14 с использованием параметрических критериев, математическим моделированием и определением прогноза их развития. Для сравнения нейроморфологических эффектов при однократном и фракционированном облучении в качестве инструментального метода использован дисперсионный анализ. Исследовали влияние одного многоуровневого фактора (облучение в дозе 0,5 Гр) на нейроморфологические показатели лобной коры. Сравнительный анализ нейроморфологических показателей проведен в ранние (1 сут) и поздние (18 мес.) сроки пострadiационного периода.

Проведенные исследования на полную продолжительность жизни животных показали, что нервная система обладает высокой функциональной чувствительностью к радиационному фактору. Выявленные изменения при данных режимах облучения неспецифичны, протекают волнообразно и не имеют линейной дозовой или временной зависимости. При всех дозах и сроках пострadiационного периода преобладают пограничные изменения, отражающие различные варианты физиологической нормы нейронов. Такие изменения обратимы и в определенных условиях на их основе могут возникать различные формы альтеративных или адаптационных изменений. Все изменения встречаются как в контрольных, так и экспериментальных группах, отличаясь лишь процентным соотношением, что согласуется с данными других исследователей [3, 4, 5]. Наряду с этим отмечается увеличение количества деструктивных нейронов, расположенных изолированно и не образующих патологических скоплений. При этом у облученных животных не установлено статистически значимого снижения количества нервных клеток на площади по сравнению с контролем.

В ранние сроки наблюдения на динамику функциональной активности малых пирамидных нейронов более значимое влияние оказывало фракционированное облучение. Эффект воздействия довольно высок: уровень значимости модели менее $1 \cdot 10^{-19}$ при коэффициенте детерминации $R^2=0,96$ и сильной корреляции аргументов ($r=0,98$). Эффект воздействия облучения на динамику деструктивных нейронов мал: уровень значимости модели составляет более 0,5 при коэффициенте детерминации $R^2=0,08$ и слабой корреляции аргументов ($r=0,28$). Показатели нормохромных и деструктивных нейронов не зависели от режима облучения. Среди больших пирамидных нейронов (V слой коры) количество нейронов с функциональными изменениями (гипо- и гиперхромные) зависело от однократного облучения (при уровне значимости менее 0,05), а при фракционированном воздействии достоверной зависимости не наблюдалось. Количество деструктивных нейронов зависело от всех режимов облучения (уровень значимости менее 0,05), но фракционированное воздействие оказывало более сильное влияние на их динамику. Эффект воздействия фракционированного облучения на динамику деструктивных нейронов высокий: уровень значимости модели менее 0,05 при коэффициенте детерминации $R^2=0,70$ и сильной корреляции аргументов $r=0,84$. Содержание белка в нейронах больше зависело от однократного облучения, которое в 2 раза сильнее влияло на динамику показателя по сравнению с фракционированным облучением. На содержание цитоплазматической и ядрышковой РНК, а также ядерной ДНК большее влияние оказывало фракционированное воздействие, а на размеры структур, где локализованы эти нуклеиновые кислоты большее влияние оказывало однократное воздействие.

В поздние сроки наблюдения среди малых пирамидных нейронов количество клеток с функциональными изменениями (гипо- и гиперхромные) больше зависело от фракционированного облучения. Уровень значимости модели менее 0,05 при

коэффициенте детерминации $R^2=0,63$ и сильной корреляции аргументов ($r=0,79$). Количество деструктивных нейронов зависело от однократного облучения, которое в 4,4 раза сильнее влияло на динамику данного типа клеток по сравнению с фракционированным. Эффект воздействия облучения на динамику показателя высокий: уровень значимости модели менее 0,05 при коэффициенте детерминации $R^2=0,73$ и сильной корреляции аргументов ($r=0,85$). Среди больших пирамидных нейронов количество клеток с функциональными изменениями (гипо- и гиперхромные) больше зависело от однократного облучения, которое в 2,4 раза сильнее влияло на динамику показателя по сравнению с фракционированным. Эффект воздействия облучения на изменение функциональной активности нейронов средний: уровень значимости модели менее 0,05 при коэффициенте детерминации $R^2=0,37$ и умеренной корреляции аргументов ($r=0,61$). Количество деструктивных нейронов зависело от всех режимов облучения, но фракционированное оказывало более сильное влияние на динамику показателя по сравнению с однократным облучением. Уровень значимости модели менее 0,05 при коэффициенте детерминации $R^2=0,58$ и сильной корреляции аргументов ($r=0,76$). Однократное облучение оказывало большее влияние на изменения содержания ДНК в ядрах и РНК в ядрышках нейронов по сравнению с фракционированным воздействием. Уровень значимости показателей содержания белка в нейронах и площадь цитоплазмы превышает значение 0,05 (а в случае содержания белка даже 0,86), поэтому сравнение этих показателей не достоверное.

Таким образом, несмотря на ряд особенностей динамики нейроморфологических показателей при однократном и фракционированном облучении, изученные режимы гамма облучения в дозе 0,5 Гр не вызывают в функционально различных слоях лобной коры больших полушарий головного мозга значимых альтеративных изменений. Вместе с тем не соответствие ряда нейроморфологических показателей в отдельные сроки наблюдения возрастному контролю свидетельствует о определенной нестабильности структурно-функциональной организации нейронов и напряженности их функционирования, что на фоне воздействия других вредных и опасных факторов может служить фоном для развития патологического процесса в нервной системе.

Список литературы

1. Ушаков И.Б., Федоров В.П., Саурина О.С. Радиационные морфофункциональные эффекты мозга. Воронеж: Научная книга, 2010. 287 с.
2. Ушаков И.Б., Федоров В.П. Малые радиационные воздействия и мозг. Воронеж: Научная книга, 2015. 536 с.
3. Ушаков И.Б., Федоров В.П., Гундарова О.П. Нейроморфологические корреляты малых радиационных воздействий // Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. 2016. № 1. 71-78
4. Ушаков И.Б., Федоров В.П. Нейроморфологические корреляты пролонгированных радиационных воздействий // Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. 2018. № 3. 85-95
5. Федоров В.П., Ушаков И.Б., Федоров Н.В. Церебральные эффекты у ликвидаторов Чернобыльской аварии. Саарбрюккен: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2016. 390 с.

**ОСОБЕННОСТИ РАДИОМОДИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ
ИНГИБИТОРОВ СИНТАЗ ОКСИДА АЗОТА И ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ИХ
ПРИМЕНЕНИЯ В ЯДЕРНОЙ МЕДИЦИНЕ**

*А.С. Филимонов, М.В. Филимонова, М.В. Макаrchук, Л.И. Шевченко, А.С. Сабурова,
В.И. Суринова, М.Ю. Ксендзук, А.А. Шитова, О.В. Солдатова*

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ НМИЦ
радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия, e-mail: filimonov_alex@mail.ru

Резюме. Ингибиторы NOS привлекли внимание радиобиологов и фармакологов высокой противолучевой активностью еще в 1960-е годы, задолго до открытия биологических функций эндогенного NO. В работах, посвященных радиационной фармакологии, такие соединения, по-прежнему, многими авторами рассматриваются как вид «серосодержащих радиопротекторов», подобных аминотиолам. Однако анализ накопленных данных и результаты собственных исследований позволяют существенно шире оценивать радиомодифицирующий потенциал ингибиторов NOS. Такие соединения имеют структурные особенности, определяющие биологическую активность и обладают собственным специфическим молекулярным механизмом действия, позволяющим проявлять широкий спектр радиомодификации – оказывать радиозащитное, радиомитигационное действие и осуществлять селективную профилактику острых и отдаленных осложнений лучевой терапии.

Ключевые слова: ингибиторы NOS, радиопротекторы, радиомитигаторы, средства профилактики осложнений радиотерапии

**PECULIARITIES OF NITROGEN OXIDE SYNTHESIS INHIBITORS
RADIOMODIFYING ACTIVITY AND PROSPECTS OF THEIR APPLICATION IN
NUCLEAR MEDICINE**

*A.S. Filimonov, M.V. Filimonova, M.V. Makarchuk, L.I. Shevchenko, A.S. Saburova,
V.I. Surinova, M.Yu. Ksendzук, T.S. Zybinova, A.A. Shitova, O.V. Soldatova*

A.Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research
Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia,
e-mail: filimonov_alex@mail.ru

Summary. The high anti-radiation activity of NOS inhibitors attracted the attention of radiobiologists and pharmacologists back in the 1960s, long before the discovery of the biological functions of endogenous NO. In works devoted to radiation pharmacology, such compounds are still considered by many authors as a type of "sulfur-containing radioprotective" similar to aminothiols. However, the analysis of the accumulated data and the results of our own studies make it possible to significantly evaluate the radio modifying potential of NOS inhibitors. Such compounds have structural features that determine their biological activity, and their own specific molecular mechanism of action. This allows them to exhibit a wide range of radiomodification - to provide a radioprotective, radiomitigational effect and to selectively prevent the complications of radiation therapy.

Key words: inhibitors NOS, radioprotectors, radiomitigators, means of preventing complications of radiotherapy

В настоящее время известно, что многие ингибиторы синтаз оксида азота (NOS) различных химических классов проявляют значительную противолучевую активность. Тем не менее, в силу научного консерватизма, такие соединения, как и их первые представители, привлекшие внимание радиобиологов еще в 1960-70 годы, по-прежнему рассматриваются многими специалистами в области радиационной фармакологии как

вид «серосодержащих радиопротекторов» в общем ряду аминотиолов. Однако анализ накопленных данных и результаты собственных исследований, по нашему мнению, позволяют существенно шире оценивать потенциал радиомодифицирующей активности ингибиторов NOS.

Так, специфические особенности молекулярной структуры таких соединений – наличие гуанидинового, амидинового или тиамидинового фрагмента, изостеричного гуанидиновой группе L-аргинина, – определяют их биохимическую и фармакологическую активность, позволяют им взаимодействовать с оксидазным центром и выполнять роль псевдосубстрата NOS. Вследствие чего экстренное радиозащитное действие этих соединений реализуется по специфическому молекулярному механизму – путем подавления эндотелий-зависимого eNOS/sGC/cGMP-пути релаксации сосудов.

Радиозащитный эффект при этом реализуется в гипоксической манере – сосудосуживающее действие вызывает рефлекторное снижение сердечного выброса и развитие транзиторной гипоксии. Причем, такой механизм противолучевой активности ингибиторов NOS не только сближает их с вазоактивными радиопротекторами – агонистами $\alpha 1$ -аренорецепторов и 5-HT₂ рецепторов серотонина, действующими путем активации эндотелий-независимого вазопрессорного PLC/IP₃/PKC-пути, но и сопровождается синергическим радиозащитным эффектом при их сочетанном применении, что, потенциально, позволяет в дальнейшем осуществить дизайн оптимальных по эффективности и безопасности гипоксических радиопротекторов.

При этом важной, практически значимой особенностью экстренной противолучевой активности ингибиторов NOS является не только высокая эффективность (ФИД – 1,6-1,8), но и относительная безопасность. В отличие от аминотиолов, эффективно действующих только при субтоксических дозах, средние эффективные и оптимальные радиозащитные дозы ингибиторов NOS T1023 и T1082 в 4-9 раз ниже максимально переносимых доз.

Противолучевой потенциал ингибиторов NOS, судя по всему, позволяет им проявлять и активность радиомитигаторов. Так, в нашей лаборатории в последнее время в повторных экспериментах было установлено, что 1-2-кратное введение ингибитора NOS T1023 на 3-6 сутки после облучения самостоятельно, выражено снижает тяжесть течения ОЛБ у мышей и достоверно повышает их выживаемость при средне и абсолютно летальных дозах γ -излучения. В настоящее время изучаются механизмы такого терапевтического эффекта и взаимодействие ингибитора NOS с другими митигаторами и средствами лечения ОЛБ.

Кроме того, радиомодифицирующие возможности ингибиторов NOS имеют значительный потенциал для онкологии и ядерной медицины. В наших исследованиях установлено, что противолучевое действие ингибиторов NOS T1023 и T1082 эффективно защищает нормальные соматические ткани (ФИД – 1,4-1,7), но при этом радиозащитный эффект в малигнизированных тканях солидных опухолей животных не развивается. На моделях лучевой терапии саркомы M-1 у крыс и солидной карциномы Эрлиха у мышей при однократном и фракционированном лучевом воздействии эти ингибиторы NOS выражено и статистически значимо снижали частоту и тяжесть острых (лучевые повреждения кожи) и отдаленных (лучевой пневмофиброз) лучевых «токсических» эффектов, но не модифицировали противоопухолевые эффекты γ -излучения и не снижали эффективность радиотерапии.

Таким образом, радиомодифицирующие возможности ингибиторов NOS позволяют рассматривать их как перспективную основу для инновационных фармакологических средств защиты от радиационных воздействий, а также профилактики осложнений лучевой терапии, способных значительно ограничить

«токсичность» многих существующих методов лучевой терапии и повысить качество лечения онкологических заболеваний.

Выводы

1. С точки зрения радиационной фармакологии ингибиторы NOS целесообразно рассматривать как самостоятельный класс противолучевых средств, отличающийся специфическим механизмом фармакологической активности и широким спектром радиомодифицирующих эффектов, имеющих важное значение для решения современных проблем радиационной безопасности и ядерной медицины.
2. Анализ имеющихся данных и результаты собственных исследований позволяют рассматривать ингибиторы NOS и, в частности, соединения T1023 и T1082, как перспективную основу для разработки эффективных и безопасных радиопротекторов, радиомитигаторов и средств профилактики осложнений лучевой терапии.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ КОМБИНАЦИЙ ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ В ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

Филимонова А.Н.¹, Евстратова Е.С.², Петин В.Г.²

1 - ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

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

filimonowa.af@gmail.com

Резюме. Получены новые экспериментальные данные о влиянии солей тяжелых металлов, ионизирующего излучения и гипертермии на выживаемость диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* после раздельного и одновременного применения этих агентов. Синергическое взаимодействие этих агентов при постоянной концентрации препаратов регистрируется лишь в пределах определенного температурного диапазона, внутри которого имеется оптимальная температура, при которой наблюдается максимальный синергический эффект.

Ключевые слова: тяжелые металлы, синергизм, ионизирующее излучение, гипертермия, комбинированные действия, дрожжевые клетки, последовательное действие

DEVELOPMENT OF NEW COMBINATIONS OF CHEMICAL AGENTS WITH VARIOUS PHYSICAL FACTORS IN RADIATION THERAPY

Filimonova A.N.¹, Evstratova E.S.¹, Petin V.G.²

1 - FSBI "NMIC of radiology" of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia;

2 - A. Tsyb MRRC, Obninsk, Russia

filimonowa.af@gmail.com

Summary. New experimental data were obtained on the effect of heavy metal salts, ionizing radiation, and hyperthermia on the survival of diploid yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* after separate and simultaneous use of these agents. The synergistic interaction of these agents at a constant concentration of drugs is recorded only within a certain temperature range, inside which there is an optimum temperature at which the maximum synergistic effect is observed.

Key words: heavy metals, synergism, ionizing radiation, hyperthermia, combined actions, yeast cells, sequential action

Актуальность. Ежегодно более 500 официально зарегистрированных веществ внедряются в практику в виде лекарственных препаратов, пищевых добавок, пестицидов и промышленных соединений, загрязняющих окружающую среду [1]. Многие лекарственные средства используются в комбинации с ионизирующим излучением или гипертермией для повышения эффективности лечения злокачественных новообразований [1, 2]. Комбинированное действие ионизирующего излучения с различными химиопрепаратами часто используется для повышения радиочувствительности опухолевых клеток при лучевой терапии опухолей [2, 3]. Существует большое количество работ по изучению влияния одновременного и последовательного комбинированного действия ионизирующего излучения с химическими агентами на выживаемость клеток различного происхождения [1, 2, 3].

Наиболее интересным является изучение характера наблюдаемых эффектов при

комбинированном действии ионизирующего излучения и других агентов с солями тяжёлых металлов, являющихся перспективными в практическом применении радиобиологических подходов лучевой терапии [1, 2]. Известны соединения тяжёлых металлов (например, цисплатин), которые могут применяться одновременно с лучевой терапией опухолей. Тяжелые металлы как микроэлементы постоянно встречаются в почве, воде, растениях и организмах животных и человека. Сложность количественной оценки комбинированного воздействия обуславливается двумя факторами – недостаточностью знаний о молекулярно-клеточном механизме действия каждого фактора и их сочетаний, а также отсутствием единого методологического и концептуального подхода к изучению механизма синергического взаимодействия факторов различной природы. Было бы интересно исследовать экспериментально их совместное действие с гипертермией или с ионизирующим излучением для оптимизации методов сочетанной терапии.

Материалы и методы. Объектом экспериментальных исследований были диплоидные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800), на которых в стационарной стадии роста воздействовали гипертермией (43–52,5 °С), химическим препаратом, содержащим соль тяжелого металла (хром) и одновременным действием гипертермии с солями тяжелых металлов. Используемые в экспериментах диплоидные дрожжевые клетки, являются простейшей моделью эукариотических клеток, строение которых сходно с клетками высших организмов и которые характеризуются наличием ядра и хромосом.

Для одновременного действия гипертермии с химическими препаратами интервал времени между помещением клеток в предварительно прогретую стерильную воду и началом воздействия составлял 0,1–0,3 мин, что было значительно меньше общей продолжительности воздействия, которое осуществляли в термостатированном сосуде, где нужная температура поддерживалась в пределах $\pm 0,1$ °С. В опытах использован раствор соли тяжелого металла: – $K_2Cr_2O_7$ 0,05; 0,5; 1,5 и 5 мг/мл. По окончании раздельного применения гипертермии, химического препарата и их одновременного комбинированного воздействия клетки помещали в чашки Петри с питательной средой так, чтобы 150–200 колоний образовывались после 3–5 суточной инкубации дрожжевых клеток при 30 °С. Выживаемость клеток оценивали отношением колоний, сформированных при воздействии разных факторов к числу колоний, образованных в контроле. Все экспериментальные серии повторяли 3–5 раз. Результаты представлены в виде среднего значения и его стандартной ошибки. Детали методов культивирования, определения выживаемости, статистической обработки описаны ранее [2, 4, 5].

Результаты. Получены кривые выживаемости, необходимые для определения характера взаимодействия. Во всех случаях наблюдается их синергическое взаимодействие – эти кривые расположены ниже ожидаемых при независимом сложении эффектов от каждого агента. Для количественной оценки степени синергизма мы использовали коэффициент синергического усиления (k) [2, 4, 5], описанный выше. Вместо дозы в данном исследовании мы использовали продолжительность воздействия. Этот коэффициент показывает, во сколько раз для одинакового эффекта уменьшилась продолжительность ожидаемого воздействия по сравнению с наблюдаемой в эксперименте величиной.

Найдены закономерности проявления синергизма при одновременном комбинированном действии гипертермии (43–52,5 °С) с раствором тяжелого металла $K_2Cr_2O_7$ различной концентрации на выживаемость дрожжевых клеток. Получено экспериментально, что максимальное синергическое взаимодействие раствора

тяжелого металла и гипертермии наблюдалось при концентрации 0,5 мг/мл при температуре 47 °С, и коэффициент синергического взаимодействия равнялся 2,5, а при увеличении концентрации до 5 мг/мл максимум синергического взаимодействия наблюдался при температуре 50 °С и равнялся 3,3.

Обсуждение. Синергические эффекты пока не учитываются в клинических исследованиях. Это обусловлено тем, что в существующей медицинской практике противоопухолевые препараты и модифицирующие физические агенты главным образом используются последовательно друг с другом. Хорошо известно, что в этом случае синергический эффект отсутствует или значительно уменьшен. Согласно ранее представленной математической модели [4], описывающей последовательные комбинированные воздействия различных факторов, необходимости учитывать последовательности применяемых агентов для достижения максимального синергизма. Поскольку наша работа направлена на изучение химических веществ, содержащих тяжелые металлы, представляет интерес получить аналогичные данные для последовательного взаимодействия применения солей тяжелых металлов с различными физическими факторами. На примере запланированных в данной работе исследований будет продемонстрирована возможность значительного увеличения коэффициента синергического взаимодействия при одновременном применении агентов, а также при их последовательном взаимодействии. В случае положительных результатов хотелось бы, чтобы подобное применение было внедрено в медицинскую практику. Результаты данной работы имеют фундаментальную и практическую значимость для оптимизации комбинированных воздействий и обеспечения максимального синергического взаимодействия, а также для понимания и теоретической интерпретации биологических эффектов комбинированных воздействий.

Выводы. Новые результаты связаны с зависимостью коэффициента синергического усиления от концентрации исследуемых агентов – то есть при снижении концентрации применяемого препарата, при котором найдено максимальное значения этого коэффициента, также снижается и значение температуры, при которой наблюдается этот эффект. Следовательно, диапазон применяемых температур, синергически действующий с данным агентом, смещается в область меньших значений температуры.

Список литературы

1. Choy, H. (Ed.) Chemoradiation in Cancer Therapy / H. Choy. – Totowa, NJ, USA: Humana Press., 2003. – 420 p.
2. Цыб, А.Ф. Терапевтическая радиология/ А.Ф. Цыб, Ю.С. Мардынский / М.: Медицинская книга. – 2010. – 552 с.
3. Berthoud, H.R. Synergy: a concept in search of a definition / H.R. Berthoud / Endocrinology. – 2013. – V. 154. – P. 3974–3977.
4. Петин, В.Г. Радиобиологические основы синергических взаимодействий в биосфере / В.Г. Петин, Г.П. Жураковская, Л.Н. Комарова. – М.: ГЕОС, 2012. – 219 с.
5. Evstratova E.S., Petin V.G., Zhurakovskaya G.P. Synergistic effects and their potential significance for the influence of natural intensities of environmental factors on cell growth. Synergy. 2018. V. 6, № 1. P. 1–8.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАДИОНУКЛИДНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ПОМОЩИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ С КОСТНЫМИ МЕТАСТАЗАМИ

*И.К. Хвостунов¹, В.В. Крылов¹, Т.Ю. Кочетова¹, А.А. Родичев¹, Н.Н. Шепель¹,
О.Н. Коровчук¹, В.С. Пятенко^{1,2}, Т.И. Хвостунова¹*

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба - филиал
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии»

Минздрава РФ, г. Обнинск, Россия

² ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, Москва, Россия
e-mail: igor.khvastunov@gmail.com

Резюме. Путем цитогенетического обследования онкологических больных с метастазами в скелет оценена безопасность и эффективность радионуклидной терапии с использованием радиофармпрепаратов ¹⁵³Sm-оксабифор и ²²³Ra-хлорид. Показано, что прирост индуцированных хромосомных aberrаций (радиационных маркеров) в подгруппе ²²³Ra-хлорид варьирует существенно больше, чем при использовании ¹⁵³Sm-оксабифор. Дальнейшее сопоставление подобных оценок при выборе различных видов радиофармпрепаратов впервые даст возможность объективно оценить ожидаемую эффективность применяемых радиофармпрепаратов и усовершенствовать критерии их выбора.

Ключевые слова: костные метастазы, радионуклидная терапия, побочное действие, цитогенетическое обследование, биодозиметрия.

THE ESTIMATION OF SPECIFITY OF RADIONUCLIDE THERAPY USING CYTOGENETIC EXAMINATION OF BONE METASTASIS PATIENTS

*I.K. Khvastunov¹, V.V. Krylov¹, T.Yu. Kochetova¹, A.A. Rodichev¹, N.N. Shepel¹, O.N.
Korovchuk¹, V.S. Pyatenko^{1,2}, T.I. Khvastunova¹*

¹ A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Obninsk, Kaluga Region, Russia

² N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia
e-mail: igor.khvastunov@gmail.com

Summary. The checkup of bone metastasis patients using cytogenetic examination was carried out. The estimation of radiopharmaceutical efficacy in the subgroups applying ¹⁵³Sm-oxabifor and ²²³Ra-chloride was fulfilled. It was found that the increase of radiation induced chromosomal aberrations (radiation markers) due to radionuclide therapy ranged much wider for ²²³Ra-chloride than for ¹⁵³Sm-oxabifor. The following similar investigations should first result to reasonable choice between accessible radiopharmaceutical with the object of update the guidance of administration.

Key words: born metastasis, radionuclide therapy, side effect, cytogenetic examination, biodosimetry.

Радионуклидная терапия (РНТ) при костных метастазах традиционно позиционировалась как метод симптоматического лечения. В последнее время появились доказательства наличия у РНТ противоопухолевого действия. В частности, разрабатываются новые эффективные и безопасные остеотропные радиофармпрепараты (РФП), а также схемы их применения как в режиме монотерапии, так в комбинации с другими методами лечения. Для объективной оценки эффективности той или иной схемы применения различных РФП плодотворный результат можно ожидать в результате цитогенетического обследования онкологических пациентов при сопоставительном анализе применения различных видов РФП.

Цель работы заключалась в выполнении сравнительного анализа последствий РНТ с использованием РФП ^{153}Sm -оксабифор и ^{223}Ra -хлорид на основе анализа частоты aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови онкологических пациентов. Для решения поставленной в работе задачи была сформирована группа онкологических больных для проведения цитогенетического обследования в составе 25 человек, у которых был произведен забор крови на цитогенетический анализ (11 человек с ^{153}Sm и 14 человек с ^{223}Ra). Образцы крови у всех обследованных лиц брались в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации и нормами медицинской этики после получения информированного согласия. Все обследованные пациенты проходили курс РНТ с использованием РФП ^{153}Sm -оксабифор или ^{223}Ra -хлорид в отделении радиохирургического лечения открытыми радионуклидами МРНЦ им. А.Ф. Цыба. У каждого пациента по согласованной схеме должен был производиться забор крови дважды: до начала РНТ (контроль) и спустя один месяц или более после РНТ. Кровь бралась из локтевой вены в объеме 10 мл и помещалась в специализированный вакутейнер. Методика цитогенетического анализа заключалась в подготовке препаратов метафазных хромосом лимфоцитов крови, их окрашивании и микроскопическом анализе на световом микроскопе в клетках первого митоза. Для анализа aberrаций хромосом применяли стандартный метод окрашивания по Гимза и способ анализа на основе международных рекомендаций и накопленного собственного опыта.

Цитогенетический анализ приготовленных препаратов был выполнен для 6 из 25 вовлеченных в обследование пациентов (2 пациента с ^{153}Sm и 4 – с ^{223}Ra). По итогам проведенного цитогенетического обследования в подгруппе ^{153}Sm было проанализировано 750 метафаз до начала РНТ и 500 метафаза после ее окончания. В подгруппе ^{223}Ra было проанализировано 1000 метафаз до начала РНТ и 900 метафаз после ее окончания. В результате были выявлены следующее число радиационных маркеров. Подгруппа ^{153}Sm : до РНТ - центрических колец – 1, дицентриков – 6, после РНТ - центрических колец – 4, дицентриков – 10. Подгруппа ^{223}Ra : до РНТ - центрических колец – 7, дицентриков – 22, после РНТ - центрических колец – 20, дицентриков – 87.

Таким образом, оценка частоты радиационных маркеров составила: в подгруппе ^{153}Sm - до РНТ 0.93 ± 0.35 для суммы дицентриков и центрических колец и 0.80 ± 0.16 для дицентриков, а после РНТ - 2.80 ± 0.75 и 2.00 ± 0.63 , соответственно. В подгруппе ^{223}Ra - до РНТ 2.90 ± 0.54 для суммы дицентриков и центрических колец и 2.20 ± 0.47 для дицентриков, а после РНТ - 11.9 ± 1.15 и 9.67 ± 1.04 , соответственно. В результате было показано, что частоты радиационных маркеров как до, так и после РНТ в обеих подгруппах превышают принятый спонтанный уровень, который оценивается величиной 0.1, что является объективным индикатором предшествующего радиационного воздействия. Прирост частоты радиационных маркеров в результате РНТ составил: в подгруппе ^{153}Sm - 1.87 ± 1.10 для суммы дицентриков и центрических колец и 1.20 ± 0.79 для дицентриков. Соответственно, в подгруппе ^{223}Ra прирост составил - 9.00 ± 1.69 и 7.47 ± 0.51 .

Для решения поставленной в исследовании задачи метод цитогенетического обследования доказал свою специфичность и перспективность в отношении оценки побочных последствий РНТ. По критерию прироста частоты радиационных маркеров в лимфоцитах крови после РНТ применение РФП ^{223}Ra -хлорид приводит к более высокому, в 5 - 6 раз, радиационному эффекту, чем при использовании РФП ^{153}Sm -оксабифор. Дальнейшее сопоставление таких оценок при выборе различных видов РФП впервые даст возможность объективно оценить ожидаемую эффективность применяемых РФП и усовершенствовать критерии их выбора.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

А.А. Цышинатти¹, С.М. Роднева¹, Н.М. Сметанина¹, Ю.А. Федотов¹, Д.В. Гурьев^{1,2}
¹ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна
ФМБА России, ²Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н.
Семенова РАН, Москва, Россия, e-mail: Denis.Guryev@gmail.com

Резюме. В работе получены радиорезистентные клетки карциномы легкого человека (линия А549) после острого рентгеновского облучения в дозе 15 Гр. Выявлено, что после тестирующего облучения в дозе 10 Гр у радиорезистентных клеток значительно снижается уровень остаточных фокусов γ H2AX и количество микроядер. Также показана более высокая клоногенная способность радиорезистентных клеток. Предполагаем, что радиорезистентность в исследуемых клетках связана с более эффективной репарацией двунитевых разрывов ДНК.

Ключевые слова: рентгеновское облучение, опухолевые клетки, радиорезистентность, γ H2AX, микроядерный тест, клоногенная способность

STUDY OF HUMAN TUMOR CELLS RADIORESISTANCE MECHANISMS

A.A. Tsishnatti¹, S.M. Rodneva¹, N.M. Smetanina¹, Yu.A. Fedotov¹, D.V. Guryev^{1,2}
¹State Research Center - Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, ²N.N.
Semenov Federal Research Center for Chemical Physics of RAS, Moscow, Russia, e-mail:
Denis.Guryev@gmail.com

Summary. The radioresistant human lung carcinoma cells (line A549) were obtained after acute X-ray irradiation at a dose of 15 Gy. It was revealed that the level of residual foci γ H2AX and the number of micronuclei are significantly reduced in radioresistant cells after testing irradiation at a dose of 10 Gy. Moreover, a higher clonogenic ability of radioresistant cells is shown. We assumed that the radioresistance in the studied cells is associated with a high capacity to double strand DNA breaks repair.

Key words: X-ray, tumor cells, radioresistance, γ H2AX, micronucleus test, clonogenic ability

В настоящее время лучевая терапия является одним из основных методов лечения злокачественных новообразований. Известно, что в клетках человека в ответ на радиационно-индуцированные повреждения ДНК запускаются процессы, направленные на поддержание стабильности клеточного генома, такие как задержка клеточного цикла, репарация повреждений, индукция апоптотической гибели клетки [1, 2]. В эти процессы включены многие десятки, если не сотни генов. При этом изменение их экспрессии, как правило, приводит к увеличению чувствительности клеток к действию ионизирующего излучения. Вместе с тем возможные рецидивы после радиационной терапии злокачественных опухолей связаны с возникновением *de novo* либо отбором уже существующих клеточных клонов опухоли, резистентных к воздействию ионизирующих излучений [3]. Выяснение причин и механизмов этой резистентности, а вместе с тем и поиск способов её снижения, остается актуальной задачей экспериментальной и клинической онкологии и радиационной биологии на протяжении многих лет. Целью настоящего исследования было выявление особенностей формирования радиорезистентности опухолевых клеток на молекулярно-клеточном уровне.

Материал и методы исследований. В работе использовали клетки карциномы легкого человека (линия А549). Культивирование клеток проводили в стандартной

среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин, антибиотики в условиях 5% содержания CO₂ в атмосфере и температуре 37°C. Для получения радиорезистентных клеточных клонов, культуру подвергали однократному воздействию рентгеновского излучения на установке РУСТ-1М (Россия) в дозе 15 Гр и культивировали в течение одной недели для получения популяции активно пролиферирующих клеток. В дальнейшем облученные (радиорезистентные, группа «15 Гр») и необлученные (группа «Контроль») клетки подвергали острому однократному облучению в дозах 5 и 10 Гр. В обеих группах проводили сравнительный количественный анализ остаточных фокусов (спустя 24 часа после облучения) фосфорилированного корового гистона H2AX (γ H2AX) как маркера двуниевых разрывов ДНК (ДР ДНК), микроядер в двуядерных клетках, обработанных цитохалазином-Б с целью блокирования цитокинеза, а также клоногенную способность радиорезистентных и контрольных клеток без дополнительного воздействия. Так, для количественного анализа фокусов γ H2AX проводили иммуноцитохимическое окрашивание клеток, высаженных в 6-луночные планшеты на покровных стеклах. Анализировали не менее 200 клеток на экспериментальную точку. Для подсчета числа фокусов γ H2AX использовали программу FoCo (<https://sourceforge.net/projects/focicount>).

Для количественной оценки уровня цитогенетических нарушений проводили подсчет микроядер в клетках с заблокированным цитохалазином-Б цитокинезом. Слайды окрашивали акридиновым оранжевым, подсчитывали минимум 500 двуядерных клеток в каждой группе.

Для сравнения клоногенной способности облученных (радиорезистентных) и необлученных (контрольных) клеточных клонов без дополнительного воздействия клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, высаживали в 60 мм чашки Петри из расчета 100 клеток на чашку. Для формирования хорошо видимых колоний (50 и более дочерних клеток) чашки инкубировали в полной питательной среде в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37°C с 5% содержанием CO₂ в атмосфере в течение 14 дней. После этого, колонии фиксировали метанолом и окрашивали красителем Гимза.

В результате проведенных исследований выявлено значительное снижение остаточных фокусов γ H2AX в клетках группы «15 Гр» по сравнению с группой «Контроль» после дополнительного облучения культур в дозе 10 Гр. При сравнении групп «Контроль» и «15 Гр» как без дополнительного воздействия, так и после воздействия рентгеновским излучением в дозе 5 Гр, значительных изменений не выявлено. Предполагают, что остаточные фокусы являются результатом неотрепарированных ДР ДНК и потенциально опасны для дальнейшей судьбы клетки [4]. В конечном итоге, они могут привести к различным цитогенетическим нарушениям и, как следствие, гибели клетки. Действительно, выявлено значимое снижение количества микроядер в группе «15 Гр» после дополнительного воздействия рентгеновским излучением в дозах 5 и 10 Гр по сравнению с клетками группы «Контроль». Причем, в предварительно облученных культурах доля клеток, содержащих три и более микроядер, крайне низка. Известно, что формирование микроядер в делящихся клетках связано с образованием ацентрических фрагментов или потерей целых хромосом во время деления, что является результатом неполной или ошибочной репарации ДР ДНК [5, 6]. По всей видимости, в этом случае происходит селекция клеток, имеющих более высокий потенциал по репарации ДР ДНК, тогда как клетки, не способные к репарации остаточных повреждений (согласно остаточным фокусам γ H2AX) за это время элиминируют.

Для оценки способности клеток давать репродуктивно активные клетки, был

проведен клоногенный тест предварительно облученных и необлученных клеток (группы «15 Гр» и «Контроль»). Как известно, общая клеточная гибель включает в себя интерфазную и репродуктивную. Репродуктивная гибель происходит через ряд делений и заключается в неспособности клеток формировать колонии. Согласно полученным результатам в трех независимых экспериментах по оценке способности интактных (группа «Контроль») и радиорезистентных (группа «15 Гр») клеток образовывать колонии выявлено, что клоногенность клеток группы «15 Гр» более высокая, что подтверждает данные, полученные по фокусам репарации ДР ДНК и цитогенетическим нарушениям, а именно способность радиорезистентных клеток более успешно репарировать летальные для клетки повреждения ДНК. Эти результаты согласуются с данными, полученными на опухолевых стволовых клетках разных линий, где выявлена более быстрая и успешная пролиферация этих клеток после радиационного воздействия [7].

Таким образом, одним из механизмов, определяющих радиорезистентность опухолевых клеток человека, является их способность более эффективно репарировать потенциально летальные повреждения генетического материала.

Список литературы

1. Bhogal N., Kaspler P., Jalali F., Hyrien O., Chen R., Hill R.P. [et al] Late residual gamma-H2AX foci in murine skin are dose responsive and predict radiosensitivity in vivo // *J. Radiat Res.* 2010. 173. P. 1–9.
2. Henning W., Stürzbecher H. W. Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance // *J. Toxicology.* 2003. Vol. 193, No.1–2. — P. 91–109.
3. Dalerba P., Cho R.W., Clarke M.F. Cancer stem cells: models and concepts// *Annu Rev Med* 2007 58: 267–284.
4. Paull T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V., Kirchgessner C.U., Gellert M., Bonner W.M. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage // *J. Curr Biol.* 2000. 10:886–95.
5. Vral A., Fenech M., Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure // *J. Mutagenesis.* 2011. 26:11–7.
6. Pliakis G., Wang H., Perrault A.R., Boecker W., Rosidi B., Windhofer F. [et al] Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation // *J. Cytogenet Genome Res.* 2004. 104:14–20.
7. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *J. Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 3983-3988, 2003

РАЗНЫЕ СПОСОБЫ УЧЕТА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

О.Г. Чередниченко, А.Л. Пилюгина

Институт общей генетики и цитологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан
cherogen70@mail.ru

Резюме. Представлены разные способы оценки радиочувствительности у людей, проживающих в радиоконтаминированном регионе (п. Долонь Семипалатинский регион, Казахстан). Проведен сравнительный анализ данных, полученных методами физической дозиметрии, *in vitro* облучения 1 Гр γ -излучения и результатов цитогенетического обследования по критерию радиочувствительности.

Ключевые слова: радиация, радиочувствительность, хромосомные aberrации, дозы облучения, дозиметрия

DIFFERENT METHODS OF ACCOUNTING INDIVIDUAL RADIO SENSITIVITY

O.G. Cherednichenko, A.L. Pilugina

Institute of General Genetics and Cytology, CN, MES RK, Almaty, Kazakhstan
cherogen70@mail.ru

Summary. Different ways of assessing the radiosensitivity of people living in a radiocontaminated region (Dolon, Semipalatinsk region, Kazakhstan) are presented. A comparative analysis of the data obtained by the methods of physical dosimetry, *in vitro* irradiation of 1 Gy of γ -radiation and the results of cytogenetic examination by the criterion of radiosensitivity was carried out.

Key words: radiation, radiosensitivity, chromosomal aberrations, radiation doses, dosimetry

Повышение радиационной нагрузки определяет настоятельную необходимость оценки дозиметрического воздействия на людей и прогнозирования медико-биологических последствий и эффективности проведения радиотерапии для конкретного человека. Цитогенетический анализ неоспорим при проведении дозиметрии, тем не менее, существуют проблемы связанные с оценкой индивидуальной радиочувствительности.

Исходя из этого, было изучено состояние радиочувствительности с использованием различных подходов у людей, хронически подвергающихся радиационному воздействию в связи с проживанием в радиоконтаминированном регионе.

Образцы периферической крови для исследований были взяты от 129 человек из п. Долонь (Семипалатинский регион, Казахстан).

Культивирование лимфоцитов и приготовление препаратов осуществляли по стандартной методике [1].

Сведения о средних дозах облучения жителей за год, определенных методами физической дозиметрии проведены и предоставлены Институтом радиационной безопасности и экологии НЯЦ РК (г.Курчатов, Казахстан).

Радиационная обработка - образцы цельной крови обследуемых в пластиковых флаконах облучали γ -квантами в дозе 1 Гр на аппарате дистанционной лучевой терапии с кобальтовым зарядом «Терагам» с номинальной энергией ускоренных электронов 1,5 МЭВ и мощностью 0,1Гр/мин (НИИ онкологии и радиологии, Алматы, Казахстан).

Полученные результаты обрабатывали традиционными методами вариационной статистики [2].

Подходов к распределению людей по степени радиочувствительности может быть, по крайней мере, три. Один - исходя из общей дозы в год, получаемой жителями в обследуемом поселке согласно расчетам физическими методами дозиметрии. Другой основывается на количестве лет, которые человек прожил в этих поселках и получил суммарную дозу за эти годы также согласно физическим методам дозиметрии. И третий - при дополнительном *in vitro* облучении лимфоцитов обследуемых людей.

Средняя частота хромосомных aberrаций у обследованных людей составила $2,83 \pm 0,15\%$, из них хромосомного типа - $1,96 \pm 0,12\%$, хроматидного - $0,87 \pm 0,082\%$. Индивидуальные колебания частот хромосомных aberrаций составили 1-7%.

Средняя доза γ -облучения за год, определенная методами физической дозиметрии - 2,4 мЗв/год.

При распределении по группам радиочувствительности, люди, с частотой aberrаций в 2-3%, отнесены в группу средней радиочувствительности, выше и ниже этого показателя в группы соответственно радиочувствительных и радиоустойчивых.

Первый способ - средняя радиочувствительность (59,5% людей - $2,5 \pm 0,12\%$ хромосомных aberrаций); радиочувствительные (23% людей - $4,77 \pm 0,27\%$ хромосомных aberrаций); радиоустойчивые (17,5% людей - $1,0 \pm 0,15\%$ хромосомных aberrаций). При этом группа демонстрирует нормальное распределение признака (частоты хромосомных aberrаций). Группы людей разной степени радиочувствительности при одинаковой дозе в год и среднем возрасте (38-40 лет), демонстрируют достоверно различающуюся частоту хромосомных aberrаций ($p \leq 0,01$).

Такой подход хорошо применим для популяционных исследований радиочувствительности, однако, для индивидуальной дозиметрии или для математического моделирования он не приемлем, так как при постоянном значении одного из сравниваемых показателей невозможно провести корреляционный анализ и соответственно создать уравнение регрессии. Кроме того, отсутствие учета срока проживания (времени воздействия радиации) не совсем корректно (так, например, 3% хромосомных aberrаций для людей, проживших в радиоконтинминированном регионе 5 или 60 лет, имеет различную градиацию по степени радиочувствительности).

При втором подходе весь контингент обследуемых был распределен на группы исходя из полученной дозы за годы проживания в исследуемом поселке и выявленных у них цитогенетических нарушений. Средняя радиочувствительность (57,4% людей - $2,78 \pm 0,13\%$ хромосомных aberrаций, доза - 92,8 мЗв); радиочувствительные (20,9% людей - $4,10 \pm 0,27\%$ хромосомных aberrаций, доза - 77,3 мЗв); радиоустойчивые (21,7% людей - $1,75 \pm 0,17\%$ хромосомных aberrаций, доза - 112,2 мЗв).

У радиочувствительных индивидуумов при наименьшей полученной дозе выявлена наибольшая частота хромосомных нарушений и, напротив, у устойчивых индивидуумов наибольшая доза вызвала наименьшее количество хромосомных aberrаций. Соотношение когорт обследуемых по критерию радиочувствительности двумя способами в обследованных поселках достаточно соотносимо, соответствует литературным данным и близко к теоретически ожидаемому [3]. Наиболее радиочувствительной группой являются молодые люди (≤ 30 лет), наиболее радиоустойчивыми – старшая возрастная группа (≥ 50 лет).

При третьем способе определения радиочувствительности жителей п. Долонь проведено дополнительное *in vitro* облучение образцов их периферической крови дозой 1 Гр γ -излучения на G_0 стадии клеточного цикла. В среднем по группе радиочувствительность жителей п. Долонь при использовании дозы 1 Гр исходя из частоты хромосомных aberrаций, была достоверно ниже $14,2 \pm 0,30\%$, чем у здоровых

доноров $17,0 \pm 8,4\%$ (18 человек, не подвергавшихся радиационному воздействию), ($p \leq 0,01$), что свидетельствует об адаптированности обследуемого контингента людей. При этом развитие радиорезистентности при дополнительном *in vitro* облучении фиксировалось почти у 40% обследуемых, радиосенсибилизация развилась только у одного человека. Индивидуальная частота хромосомных aberrаций варьировала в значительных пределах – от 7,5 до 22%.

Индивидуальную радиочувствительность отражает коэффициент отношения частоты хромосомных нарушений, выявленных у обследованных людей к средней частоте хромосомных нарушений у здоровых доноров (18 человек) при облучении их крови аналогичной дозой γ -излучения, условно нами обозначен как «коэффициент радиочувствительности» (КР). У различных людей он колебался от 0,35 до 1,29. Жители п. Долонь со средней радиочувствительностью (КР 0,7-0,9) составили 65,1%, радиоустойчивые (КР 0,35-0,65) – 16,3%, радиочувствительные (КР 0,95 – 1,3) -18,6%.

Различия в степени радиочувствительности, вероятно, и определяют широкий спектр индивидуальной вариабельности спонтанной частоты хромосомных aberrаций в любой группе людей, особенно если это касается людей, подвергающихся радиационному воздействию.

Для оценки дозовой нагрузки на человека при хроническом воздействии радиации является актуальным установление количественных характеристик степени радиочувствительности, это может значительно уменьшить величину ошибки при определении полученных доз радиации. Также определение радиочувствительности конкретного человека может служить прогностически важным критерием при оценке риска радиационного воздействия у разных категорий людей, в том числе профессионально контактирующих с источниками ионизирующей радиации и/или планирования лучевой терапии у онкобольных.

Список литературы

- 1 Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., Battips D.M., Hungerford D.A. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood // *Experimental Cell Research*. 1960. Vol. 20. P. 613-616.
- 2 Плохинский Н.А. Алгоритмы в биометрии М.: МГУ, 1967. 82 с
- 3 Kovalev E.E., Smirnova O.A. Estimation of radiation risk based on the concept of individual variability of radiosensitivity // *AFRRI Contact Report*. 1996. № 96—1. Bethesda, V. 202 p.

РАЗВИТИЕ ПРОГРАММ ПОДГОТОВКИ И ПЕРЕПОДГОТОВКИ МЕДИЦИНСКИХ ФИЗИКОВ В МОСКОВСКОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

*А.П. Черняев^{1,2}, П.Ю. Борщеговская¹, С.М. Варзарь¹, М.В. Желтоножская¹, Лыкова
Е.Н.², Нисимов С.У.³, В.В. Розанов¹*

¹Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра физики ускорителей и радиационной медицины, ²НИИЯФ МГУ имени Д.В. Скобельцына, лаборатория пучковых технологий и медицинской физики, ³Президент Ассоциации Медицинских Физиков РФ, ³Руководитель отдела образовательных программ Роснано, Москва, Россия, e-mail: alexeevapo@mail.ru

Резюме. Проблема недостаточного числа квалифицированных специалистов, которые могут работать на высокотехнологичном оборудовании, поставляемом в отделения лучевой терапии, может быть решена с помощью обучения кадров по специализированным программам. В докладе пойдет речь о разработке и развитии программы профессиональной переподготовки физиков и инженеров для лучевой терапии в МГУ имени М.В. Ломоносова при сотрудничестве с ведущими научными центрами.

Ключевые слова: медицинская физика, лучевая терапия, программа переподготовки, переподготовка кадров, система оценки медицинских физиков

THE DEVELOPMENT OF TRAINING AND RETRAINING OF MEDICAL PHYSICISTS PROGRAMS AT MOSCOW UNIVERSITY

*A.P. Chernyaev^{1,2}, P.Yu. Borshchegovskaya¹, S.M. Varzar¹, M.V. Zheltonozhskaya¹,
E.N. Lykova², S.U. Nisimov³, V.V. Rozanov¹*

¹Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, ²Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, ³Fund for Infrastructure and Educational Programs RUSNANO, Moscow, Russia, e-mail: alexeevapo@mail.ru

Summary. The problem of insufficient number of qualified specialists who can work on high-tech equipment supplied to radiotherapy departments can be solved with the help of specialized training programs. The report will focus on the program development of professional retraining of physicists and engineers for radiotherapy at Lomonosov Moscow state University in cooperation with leading research centers.

Key words: medical physics, radiotherapy, retraining program, retraining of specialists, the system of assessment of medical physicists

В современное обязательное оснащение медицинских центров входит оборудование, в котором применяются физические технологии, основанные на принципе действия ионизирующего излучения, это оборудование для диагностики, профилактики и терапии заболеваний.

В настоящее время проводится регулярное переоснащение российских медицинских центров новейшими аппаратами, однако существует проблема недостаточного числа квалифицированных специалистов, которые могут работать на поставляемом оборудовании.

В докладе пойдет речь о медицинских физиках, отвечающих за гарантию качества и безопасность лучевой диагностики и терапии. Для успешной работы такого специалиста необходима специализированная подготовка. В настоящее время в нашей стране медицинских физиков всего около 640 штатных сотрудников, а инженерно-технического персонала менее 300 сотрудников. Для того, чтобы выйти на среднеевропейский уровень кадрового обеспечения лечебных заведений число

медицинских физиков в нашей стране необходимо увеличить в 4 раза. Проблемой является не только отсутствие соответствующих штатных единиц, но и квалифицированных специалистов, которые могут их занимать.

Понимание наличия проблемы имеется и в медицинских, и в научно-образовательных кругах. Лидерами подготовки медицинских физиков в России являются физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и Национальный исследовательский ядерный университет «Московский инженерно-физический институт», где целевые учебные программы развиваются с 1990-х годов, а также Томский политехнический университет. На физическом факультете МГУ ежегодно выпускается 20 специалистов, в НИЯУ МИФИ – 30, а в ТПУ – 7. Всего в МГУ подготовлено более 100 медицинских физиков, из них 70 работает в медицинских учреждениях. Подготовка же инженеров по эксплуатации медицинских ускорителей в России практически не осуществляется. Наиболее близкие магистерские программы действуют в МГТУ имени Н.Э.Баумана, где выпускают инженеров по эксплуатации медицинской техники.

В 2016 году по заказу Фонда инфраструктурных и образовательных программ Роснано и Проектной компании Роснано – ООО «ПЭТ-Технолоджи» в МГУ имени М.В.Ломоносова (кафедра физики ускорителей и радиационной медицины) была разработана программа профессиональной переподготовки физиков и инженеров для лучевой терапии. Соисполнителями при разработке и апробации Программы стали Национальный медицинский исследовательский центр Минздрава РФ, Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России. Приглашенными экспертами в процессе разработки Программы стали ученые и специалисты МГТУ им. Баумана, Томского политехнического университета, НИЯУ МИФИ, Российского онкологического научного центра им. Н.Н.Блохина.

Структура программы была разработана для пяти целевых групп: медицинские физики для отделений дистанционной, контактной и протонной лучевой терапии, и инженеры по эксплуатации медицинских ускорителей электронов и протонов. Общий объем программы составил 530 часов. В том числе дистанционный модуль – 100 часов (2 недели), общеобразовательный модуль – 290 часов (4 недели), и практическая подготовка – 140 часов (4 недели).

Подготовка медицинского физика складывается из трех составляющих:

1. обучение базовым знаниям по физике, математике и другим естественно-научным и гуманитарным дисциплинам. Обучающиеся осваивают общепрофессиональный цикл «Физические и биомедицинские основы лучевой терапии», который включает в себя дистанционный и очный общепрофессиональные модули по общим курсам ядерной физики, физики взаимодействия излучения с веществом, радиобиологии, дозиметрии и радиационной безопасности.

2. изучение специальных дисциплин из области медицинской, биологической и молекулярной физики. Слушатели осваивают специализированные дисциплины профессионального модуля согласно своей целевой группе.

3. проведение научно-исследовательских практических занятий в лабораториях и лечебных учреждениях. В рамках профессионального модуля слушатели проходят клиническую практику, которая проводится для групп по 2-4 человека и проходит в течении месяца (140 часов) на базе отделений лучевой терапии медицинских онкологических центров, принимающих участие в разработке и реализации образовательной программы.

После освоения программы у обучающихся формируются профессиональные компетенции, необходимые для выполнения трудовых функций специалистов отделений лучевой терапии и центров ядерной медицины. Лицам, прошедшим

соответствующее обучение в полном объеме и аттестацию, образовательным учреждением выдаются документы, позволяющие работать в качестве медицинских физиков и инженеров по эксплуатации медицинских ускорителей.

К 2019 году по данной программе профессиональной подготовки прошли обучение два набора слушателей, всего 32 человека, в том числе 10 из Узбекистана.

Так как на программу приходят слушатели как только что окончившие ВУЗы, так и уже имеющие опыт работы в клинических условиях, в настоящее время рассматривается развитие программы профессиональной переподготовки физиков и инженеров для лучевой терапии с целью оптимизации затрат времени на обучение лиц, имеющих разный уровень подготовки.

Усовершенствование касается возможности сокращения длительность этапов, для слушателей, которые не могут надолго отлучаться от мест своей работы в медицинском центре. По итогам тестирования определяются лица, готовые экстерном пройти аттестацию по части курсов очного цикла, усвоенных ими ранее. А также, для лиц, не имеющих специальной теоретической подготовки и опыта работы в медицинском учреждении в радиологическом отделении, программа может быть расширена до 1000 часов, что сравнимо с объемом часов при обучении в магистратуре.

Кроме того, со стороны медицинских центров появились заявки на разработку программы оценки медицинских физиков, которые работают в отделениях в настоящий момент.

Данные разработки позволят эффективно решать вопрос кадрового обеспечения в центрах лучевой диагностики и терапии. Гарантировать высокий уровень знаний специалистов, необходимый в лечебном процессе и принятия ответственных решений по терапевтическому использованию радиационных устройств и обеспечению радиационной безопасности пациентов и персонала.

Кроме того, все медицинские физики в процессе своей работы должны проходить повышение квалификации, так же как и врачи, раз в 5 лет. Курсы повышения квалификации медицинских физиков проводятся в МГУ, АМФР совместно с РМАПО и ФМБЦ имени А.И. Бурназяна ФМБА России. Программу повышения квалификации медицинских физиков в МГУ им. М.В. Ломоносова проходит 17 человек в год (длительностью 144 часа), в РМАПО проходит 75 человек (длительностью 90 часов), а в МАГАТЭ – 68 человек в год.

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ РАДИАЦИОННОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК В ПЛАНИРОВАНИИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

И.Н. Шейно, О.А. Угарова, Ю.А. Федотов

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, igor.sheino@rambler.ru

Резюме. Проведен анализ современных моделей гибели клеток при облучении. Рассмотрены возможности их применения в лучевой терапии. Создан банк данных значений параметров линейно-квадратичной модели и её модификаций для клеточных линий опухолей *in vitro*, а также клеток нормальных и опухолевых тканей *in vivo*.

Ключевые слова: излучение, гибель клеток, математические модели, LQ, LQL, параметры моделей.

MATHEMATICAL MODELS OF RADIATION-INDUCED CELL DEATH IN THE RADIATION THERAPY PLANNING

I.N.Sheino, O.A. Ugarova, Ju.A. Fedotov

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia, igor.sheino@rambler.ru

Summary. The analysis of modern models of cell death during irradiation is made. The possibilities of their use in radiation therapy are investigated. A data bank of the values of the parameters of the linear-quadratic model and its modifications for *in vitro* tumor cell lines, as well as *in vivo* normal and tumor tissue cells, was created.

Key words: radiation, radiobiology, mathematical modeling, cell death, model parameters

В отличие от многих других областей биологии, математическое моделирование является неотъемлемой частью лучевой терапии. Тесное взаимодействие между отдельными дисциплинами физики, биологии и медицины создает надежную базу физического и биологического моделирования лучевых реакций в тканях. Со стороны физики, разработаны передовые математические методы, которые лежат в основе оптимизации современных методов лучевой терапии, позволяя точно согласовать доставляемую поглощенную дозу с опухолями-мишенями. В тоже время, со стороны биологии, прогресс не столь очевиден. Прогнозирование радиобиологических эффектов до сих пор является основной проблемой в лучевой терапии.

Повреждающее действие ионизирующего излучения изучалось много лет. Независимо от того, является ли целью уничтожение опухолевых клеток с помощью радиотерапии или защита клеток, подвергшихся воздействию радиации, связь физических процессов с биологическими эффектами всегда была главной проблемой для радиобиологии.

Исторически повреждающее действие ионизирующего излучения представляется как зависимость вероятности выживания клоногенных клеток от поглощенной дозы. Эти зависимости известны как кривые выживаемости, и они являются отправной точкой для любого плана лечения.

Таким образом, гибель клеток является важным фактором в радиационно-индуцированных биологических повреждениях, не только потому, что она рассматривается как основная лучевая реакция, характеризующая действие ионизирующего излучения, но также и потому, что гибель опухолевых клеток является главной целью лучевой терапии [1].

Много моделей и теорий были предложены для описания выживаемости клеток в последние десятилетия, но универсальной теории гибели клеток при облучении пока нет. Целью данной работы является рассмотрение наиболее важных биофизических

моделей в радиобиологии, ориентируясь в основном на те, которые используются в планировании лучевой терапии.

Из нескольких радиобиологических моделей линейно-квадратичная (LQ) модель лучше всего подтверждена экспериментальными и клиническими данными, она проста и, поэтому получила широкое распространение. Эта модель определяет число летальных событий в клетке E при облучении ее в дозе D выражением: $E(D) = \alpha D + \beta D^2$. Доля выживших клеток S при поглощенной дозе D тогда определяется распределением Пуассона: $S(D) = \exp[-E(D)]$.

Модель LQ в основном используется для оценки эквивалентных графиков фракционирования в лучевой терапии (например, для расчета т.н. биологически эффективной дозы (BED), а также эквивалентной (по эффекту) дозы конвенционального фракционирования - (EQD₂) [2]).

В последнее время, а также, все в большей степени модель LQ применяется для прогнозирования вероятности контроля опухоли (Tumour Control Probability - TCP) и вероятности осложнения нормальной ткани (Normal Tissue Complication Probability - NTCP) с использованием логистических или пуассоновских моделей [3].

Эпоха конвенционального фракционирования (1.8-3.0 Гр/фракция) подтвердила достоверность модели LQ. Однако с появлением стереотаксической радиохирургии (SBRT) для лечения внутричерепных опухолей родилась альтернативная конвенциональному фракционированию стратегия облучения абляционной дозой (например, 8–30 Гр в одной фракции). Модель LQ, предназначена для диапазонов доз ниже биологически абляционных доз, обычно используемых в SBRT. Эта модель предсказывает непрерывную кривую изгиба в диапазоне высоких доз; однако экспериментальные данные однозначно показали линейную зависимость между дозой и логарифмом доли выживших клоногенов. Таким образом, модель LQ переоценивает влияние излучения на выживаемость в высоких дозах, обычно используемых в SBRT.

В настоящей работе рассмотрены различные модификации модели LQ необходимые для применения к режиму SBRT, учитывающий линейный характер при больших дозах – это т.н. линейно-квадратичная-линейная модель (LQL).

Линейно-квадратичная модель (как и все рассмотренные в настоящей работе ее модификации) является по сути полуэмпирической моделью и выбор подходящих параметров модели α , β и α/β имеет решающее значение для надежной оценки радиационного эффекта.

Значение параметров LQ для опухолей, опубликованное в клинических исследованиях лучевой терапии, зависит от многих клинических и методологических факторов. Следовательно, для клинического использования модели LQ параметры LQ для опухоли следует тщательно подбирать, основываясь на месте/сайте опухоли, гистологии и применяемой модели LQ. Чтобы учесть неопределенности в оценках параметров LQ, рекомендуется изучить диапазон доверительных значений [4].

В настоящей работе описывается разработанный банк данных значений параметров линейно-квадратичной модели и её модификаций для клеточных линий опухолей *in vitro*, а также клеток нормальных и опухолевых тканей *in vivo*.

Эмпирический характер LQ модели создает трудности для эффективного применения в современной лучевой терапии рака. Преимущества фракционирования обычно объясняются в терминах 4 R радиобиологии: репарация, репопуляция, реоксигенация и перераспределение, и хотя некоторые из них (в первую очередь репарация) естественным образом включены в модель LQ, другие факторы более трудно учесть без включения в нее дополнительных эмпирических параметров. Кроме того, растет интерес к ряду других факторов, которые изменяют лучевые реакции, в том числе излучения различного качества, применение лекарственных препаратов

модифицирующие лучевую реакцию, учет особенностей микроокружения опухоли и различия между пациентами в радиационной чувствительности.

Ключевой вопрос заключается в том, можно ли количественно прогнозировать макроскопические биологические эффекты, вызываемые излучением, на основе физических и химических эффектов, связанных с взаимодействиями между излучением и средой. Поэтому большой интерес вызывает различные подходы к созданию механистических (имитационных) моделей. В этом случае модельные предсказания будут основаны на нескольких основных предположениях о биофизических механизмах, лежащих в основе радиационно-индуцированной гибели клеток, но в то же время количество свободных параметров поддерживаются на минимальном уровне [5].

Кроме того, имитационное моделирование позволяет количественно оценить эффекты облучения тканей, возникающих в результате межклеточной коммуникации. Двумя основными путями этого эффекта являются радиационно-индуцированный эффект «свидетеля» и иммунные эффекты. Сигналы от соседних клеток могут привести к тому, что необлученные клетки пострадают от геномного стресса и могут погибнуть. Это отход от традиционной радиобиологии, где радиационные эффекты прогнозируются на основе дозы, доставляемой только облученной клетке. Это указывает на дальнейшую проблему при переходе от моделей на уровне клеток к клиническим эффектам.

Ожидается, что такой механистический подход даст большой импульс практическому совершенствованию новых методов терапии рака и разработке более эффективных протоколов лечения [5].

Принято считать, что математическое моделирование может также способствовать углублению нашего понимания фундаментальной радиобиологии.

Список литературы

1. Ballarini F. From DNA radiation damage to cell death: theoretical approaches. //Journal of nucleic acids, 2010, 350608. doi:10.4061/2010/350608.
2. Fowler J.F. 21 Years of biologically effective dose. //Br. J. Radiol. 2010;83:554–568. doi: 10.1259/bjr/31372149.
3. Pizarro, F., Hernández, A. Optimization of radiotherapy fractionation schedules based on radiobiological functions. //The British journal of radiology, 2017. 90(1079), 20170400. doi:10.1259/bjr.20170400
4. van Leeuwen, C. M., Oei, A. L., Crezee, J., Bel, A., Franken, N., Stalpers, L., Kok, H. P. . The alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies. //Radiation oncology, 2018, 13(1), 96. doi:10.1186/s13014-018-1040-z
5. McMahon S. J., Prise K. M. Mechanistic Modelling of Radiation Responses. //Cancers, 2019, 11(2), 205. doi:10.3390/cancers11020205

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ РАДИООТВЕТА В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Л.В.Шуленина¹, В.Ф.Михайлов¹, Д.В.Салеева¹, Н.Ф.Раева¹, А.Ф.Ткачева¹, Г.Д.Засухина²

¹ ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И.Бурназяна
ФМБА России, Москва, Россия

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва, Россия

*электронный адрес: shulenina2010@mail.ru

Резюме. Методом ПЦР в реальном времени исследовали содержание мРНК генов p53- и NFκB-систем, а также количество miR, lncRNA в клетках линии Jurkat и нормальных лимфоцитах через 1 ч и спустя 20 ч после облучения в дозе 0,1 Гр и 5 Гр. Через 1 ч после действия радиации в малой дозе в лимфоцитах обнаружена активация экспрессии P53 и снижение уровня зрелых miR-27a и miR-181a, имеющих в качестве мишени мРНК гена P53. Наблюдали ингибирование активности фактора NFκB, тестируемое по снижению содержания мРНК его генов-мишеней RHOA, cdc42 и IL6. В клетках линии Jurkat в этот период, наоборот, отмечено увеличение активности фактора NFκB. Последующее воздействие 5 Гр через 4 ч выявило формирование радиоадаптивного ответа по критерию выживаемости лимфоцитов и его отсутствие в клетках Jurkat. В выживших при адаптивном ответе лимфоцитах наблюдали увеличение содержания lncRNA RoR, miR-181a и снижение lncRNA NEAT1, lncRNA MALAT1, miR-107 по сравнению с клетками, не подвергавшимся действию адаптирующей дозы. В клетках линии Jurkat наблюдали снижение лишь lncRNA NEAT1.

Ключевые слова: микроРНК (miR), длинные некодирующие РНК (lncRNA), клетки крови, облучение

THE REGULATORY ROLE OF NON-CODING RNA IN GENE EXPRESSION IN THE FORMATION OF A RADIATION RESPONSE IN NORMAL AND TUMOR CELLS IN HUMANS

L.V.Shulenina¹, V.F.Mikhailov¹, D.V.Saleeva¹, N.F.Raeva¹, A.F.Tkacheva¹, G.D.Zasukhina²

¹State Research Center - Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² The Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow

*e-mail: shulenina2010@mail.ru

Summary. The content of mRNA of genes of the p53- and NFκB- systems were studied, as well as the amounts of miR, lncRNA in Jurkat cells and normal lymphocytes 1 hour and 20 hours after irradiation at a dose of 0.1 Gy and 5 Gy by PCR real-time. An activation of P53 expression and a decrease in the level of mature miR-27a and miR-181a, which have the P53 gene mRNA as a target, were detected 1 hour after the low-dose radiation in the lymphocytes. Inhibition of NFκB activity was observed, which was tested to reduce the mRNA content of its target genes RHOA, cdc42, and IL6. On the contrary, in Jurkat cells during this period, an increase in the activity of NFκB was noted. Subsequent exposure to 5 Gy after 4 h revealed the formation of a radioadaptive response according to the criterion of lymphocyte survival and its absence in Jurkat cells. In the surviving adaptive response lymphocytes, an increase in the content of lncRNA RoR, miR-181a and a decrease in lncRNA NEAT1, lncRNA MALAT1, miR-107 were observed compared with cells not exposed to the adaptive dose. In Jurkat cells, only lncRNA NEAT1 decreased.

Keywords: microRNA (miR), long non-coding RNA (lncRNA), blood cells, irradiation

Актуальность. Применение современных технологий для анализа генома и транскриптома показывает, что онкотрансформация клеток связана со структурными нарушениями генов и изменениями их экспрессии. В настоящее время актуальной задачей является исследование этих генетических и эпигенетических отклонений, гены и некодирующие РНК являются перспективными в качестве индивидуальных мишеней для профилактики и лечения онкозаболеваний. Выявлена важная роль таких регуляторных РНК, как miR и lncRNA в модуляции экспрессии генов и участии этих соединений в патогенезе онкологических заболеваний. Особое внимание привлекают lncRNA, многие из которых тканеспецифичны и вовлечены в развитие и прогрессирование опухоли [1]. Снижение уровня гиперэкспрессированных lncRNA в трансформированных клетках путем введения специфических для них интерферирующих РНК часто приводит к увеличению радиочувствительности опухолей за счет селективной инактивации lncRNA, либо из-за стимуляции иммунного ответа на введение РНК структур [2]. Важными внутриклеточными путями в реализации этих эффектов являются системы, связанные с транскрипционными факторами P53 и NFκB. Как показывают наши исследования, эти же системы и регуляторные РНК актуальны для реализации радиоадаптивного ответа, позволяющего повысить эффективность лучевой терапии [3]. Целью данной работы был анализ экспрессии некоторых видов РНК методом ПЦР в реальном времени в 2-х типах культивируемых клеток крови человека: лимфоцитах здоровых доноров и клетках линии Jurkat после рентгеновского облучения разными дозами.

Материалы и методы. Для ПЦР в реальном времени были подобраны праймеры, позволяющие оценить функциональную активность P53 и NFκB по транскрипции их генов-мишеней, а также содержание отдельных видов некодирующих РНК (lncRoR, lncNEAT1, lncGas5, lncMALAT1; miR-181a, miR-27a, miR-107) в нормальных лимфоцитах и клетках Т-лимфобластного лейкоза человека (линия Jurkat) при развитии адаптивного ответа. Культивирование клеток линии Jurkat и нормальных лимфоцитов после стимуляции ФГА проводили в стандартной культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина и 10% телячьей эмбриональной сыворотки при 37°C в 5% CO₂. Клеточные культуры облучали в рентгеновской установке РУБ РУСТ-М1 в дозе 0,1; 5 Гр при мощности дозы 0,2 Гр/мин (200 кВ, 1,2 мА, 1,5 мм Al). Экспрессию некодирующих РНК в культивируемых клетках оценивали через 1 ч, 4 ч и через 20 ч после облучения.

Результаты. Проведенное через 4 ч после воздействия малой дозы радиации (0,1 Гр) повторное облучение клеток в дозе 5 Гр показало наличие радиационного адаптивного ответа (АО) по критерию выживаемости в лимфоцитах и его отсутствие в клетках Jurkat.

Исследование содержания miR, lncRNA в клетках линии Jurkat и нормальных лимфоцитах через 1 ч и спустя 20 ч после облучения в дозах 0,1 Гр и 5 Гр выявило, что реакция лимфоцитов и клеток Jurkat на облучение в малой дозе различна. В первый час после облучения в дозе 0,1 Гр в лимфоцитах активируется P53-система и снижается активность NFκB-системы. Через 4 ч показатели восстанавливаются. В клетках Jurkat наблюдаются противоположные изменения: через 1 ч активируется система фактора NFκB.

Обнаружено, что в нормальных лимфоцитах при облучении в дозе 5 Гр через 20 ч статистически значимо увеличивалось содержание miR-107 в 10 раз по сравнению с необлученным контролем ($p=0,03$), а miR-27a в 1,5 раза ($p=0,02$).

У выживших через 20 ч лимфоцитов по различиям между группами «5 Гр» и «0,1 Гр + 5 Гр» выявлены показатели, характерные для адаптивного ответа (мРНК гена

P53, NEAT1, miR-181a, miR-107). В клетках линии Jurkat различий исследуемых показателей между группами «5 Гр» и «0,1 Гр + 5 Гр» через 20 ч после облучения в дозе 5 Гр, за исключением lncRNA NEAT1, не обнаруживалось.

Обсуждение

Радиоответ у человека зависит от индивидуальных особенностей, к которым относятся показатели генетического полиморфизма, иммунитет, гормональный статус, образ жизни (пища, богатая витаминами, курение, алкоголь и др.), а также от характера и дозы облучения. Облучение малыми дозами характеризуется либо развитием гормезиса (повышение иммунитета, жизнеспособность и т.д.), либо возникновением некоторых патологий, развитие которых характерно для высоких доз. Вместе с тем, радиоответ определяется также индивидуальными особенностями по чувствительности к радиации разных органов и тканей. Было показано, что клетки многих опухолей нечувствительны по сравнению с показателями нормальных клеток к действию малых доз радиации [3]. В нормальных клетках человека после действия малых доз (0,1-0,5 Гр) через небольшой интервал (4 часа) формируется резистентность к высоким дозам, которая выражается в повышении выживаемости, понижении числа индуцированных хромосомных и генных мутаций. При тех же условиях во многих опухолевых клетках такой феномен отсутствует. Этот подход может быть использован для повышения эффективности радиотерапии, когда предварительное облучение опухоли малыми дозами радиации повысит резистентность окружающих опухоль ткани к последующему облучению высокими дозами [3]. С развитием и применением высокопроизводительных генетических технологий в медицине растет интерес к некодирующим РНК в качестве новых ключевых игроков в регуляции генов, имеющих отношение как к заболеваниям, так и к действию радиации. Нами выявлены количественные изменения содержания miR и lncRNA в нормальных лимфоцитах и клетках линии Jurkat в различные сроки после действия рентгеновского излучения в высоких и низких дозах. Изменения в уровнях содержания некодирующих РНК после облучения малой дозой могут иметь отношение с одной стороны, к риску развития вторичного рака после лучевой терапии, а с другой стороны, могут отражать положительные эффекты низкой дозы радиации, связанные с увеличением радиорезистентности клеток, подавлением воспаления. Различия в радиоответе нормальных и опухолевых клеток могут рассматриваться как новый подход к защите от действия радиации нормальных тканей, окружающих опухоль. Сопоставление наших результатов с данными литературы, в том числе по экспериментам на животных, показывает, что miRs и lncRNA могут служить в качестве перспективных диагностических и прогностических биомаркеров при радиационном воздействии.

Выводы. Экспрессия miR и lncRNA представляет собой динамический и переменный процесс, зависящий от типа клеток (нормальные лимфоциты, злокачественные клетки Jurkat) и дозы радиационного воздействия. Анализ полученных результатов показывает, что miR и lncRNA перспективны для использования в качестве биомаркеров заболеваний и медиаторов ответа клеток на действие радиации.

Список литературы

1. Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer// Nature Med. 2015. v. 21. p. 1253–12612.
2. N. K. Wong. Long non-coding RNAs in hematological malignancies: translating basic techniques into diagnostic and therapeutic strategies// J Hematol Oncol. 2018. v.11.p. 131-152
3. Михайлов В. Ф., Шуленина Л. В., Раева Н. Ф., [и др]. //Влияние малых доз ионизирующей радиации на экспрессию генов и некодирующих РНК в нормальных и злокачественных клетках человека // Цитология. 2019. №6. т. 61.с.1-12.

ТЕРМО-РАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, УСТОЙЧИВЫХ К ХИМИОТЕРАПИИ

А.О. Якимова, А.В. Хохлова, В.А. Мосина, А.Е. Кабаков

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал НМИЦ радиологии Минздрава России, Обнинск,
Россия, e-mail: anna.prosovskaya@gmail.com

Резюме. В экспериментах *in vitro* проверялась возможность применения гипертермии для эффективной радиосенсибилизации опухолевых клеток с радио- и химиорезистентным фенотипом. Показано, что тепловая предобработка позволяет значительно усилить цитотоксическое действие γ -излучения на клетки MCF-7/MDR1, что доказывает возможность эффективного использования гипертермии для радиосенсибилизации радиорезистентных опухолей, которые невосприимчивы к химиотерапевтическим радиосенсибилизаторам.

Ключевые слова: транскрипционный стресс-ответ, белки теплового шока, MDR1, химиорезистентность, лучевая терапия

THERMO-RADIOSENSITIZATION OF TUMOR CELLS INSENSITIVE TO CHEMOTHERAPY

A.O. Yakimova, A.V. Khokhlova, V.A. Mosina, A.E. Kabakov

A.F. Tsyb MRRC - a branch of the National Medical Research Center of Radiology of the
Ministry of Health of Russia, Obninsk, Russia, e-mail: anna.prosovskaya@gmail.com

Summary. In *in vitro* experiments, the possibility was examined of using hyperthermia for the effective radiosensitization of tumor cells with a radio- and chemoresistant phenotype. It was shown that heat pretreatment significantly enhances the cytotoxic action of γ -radiation on MCF-7/MDR1 cells, which proves the possibility of the effective use of hyperthermia for the radiosensitization of radioresistant tumors that are insusceptible to chemotherapeutic radiosensitizers.

Key words: transcriptional stress response, heat shock protein, MDR1, chemoresistance, radiation therapy.

Поскольку многие опухоли человека оказываются резистентными к воздействию ионизирующего излучения, актуальной является проблема радиосенсибилизации – дополнительных обработок, направленных на усиление радиационного ответа в опухолях-мишенях [1]. Использование химиотерапевтических радиосенсибилизаторов не всегда эффективно, потому что злокачественные опухоли могут обладать так называемой «множественной лекарственной устойчивостью», когда специальные мембранные транспортеры быстро избавляют раковую клетку от проникающих в нее препаратов; в таких случаях, локальная гипертермия представляется альтернативным способом радиосенсибилизации.

Цель исследования: в данной работе проверялась возможность применения гипертермической обработки для радиосенсибилизации опухолевых клеток человека, обладающих радио- и химиорезистентным фенотипом. Для этого проводились сравнительные эксперименты на клетках MCF-7 – охарактеризованной клеточной линии, происходящей из карциномы молочной железы человека, и клетках сублинии MCF-7/MDR1, которые более радиорезистентны, чем клетки материнской линии MCF-7, а кроме того, обладают выраженным химиорезистентным фенотипом благодаря гиперэкспрессии в них гена *MDR1*, ответственного за множественную лекарственную устойчивость. Также изучались молекулярные механизмы термо-радиосенсибилизации.

Материал и методы

Основная часть работы проводилась на клетках линейной культуры MCF-7/MDR1. Эта радиорезистентная клеточная линия происходит из злокачественной опухоли молочной железы человека и демонстрирует феномен множественной лекарственной устойчивости из-за гиперэкспрессии гена *MDR1*. В сравнительных экспериментах использовали культуры клеток материнской линии MCF-7, которые не обладают химио- и радиорезистентностью.

Выращенные в чашках Петри клетки облучали γ -квантами (2-8 Гр) на терапевтической установке с гамма-источником ^{60}Co .

Гипертермическую обработку клеток проводили перед облучением или после него, погружая герметично закрытые чашки Петри с клеточными культурами в термостатированную водяную баню RC6 LAUDA (Германия) с температурой 42-45 °С. Кроме температуры, варьировали продолжительность пребывания клеток в условиях гипертермии.

Выживание и гибель обработанных клеток оценивали в МТТ-тесте, по их клоногенности и по уровню апоптоза и некроза (окрашивание ФИТЦ-аннексином V и йодистым пропидием) [2]. Значения факторов изменения дозы (ФИД) для 10% выживания облученных клеток рассчитывали из кривых роста клеточных колоний.

Анализ уровня экспрессии генов семейства *HSP* осуществляли при помощи ПЦР реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе «Rotor Gene» («Corbet Research», Австралия) с использованием набора реагентов «SYBR® Premix Ex Taq™ II» (TaKaRa Bio Inc., Япония) согласно инструкции производителя. Обработку данных проводили методом дельта-дельта *Ct* [3], в качестве референсного был выбран ген «домашнего хозяйства» *ALAS1*.

Для количественного анализа брались усредненные данные 4-6 независимых экспериментов, где было 4-8 параллельных проб на каждую точку. Статистическую обработку результатов проводили по критерию Манна-Уитни с помощью программы «Statistica 6.0» («Microcal Softcare, Inc.»).

Результаты

Показано, что гипертермическая обработка может значительно усилить цитотоксическое действие γ -излучения на радиорезистентные опухолевые клетки линии MCF-7/MDR1, которые невосприимчивы к «химиотерапевтическим» радиосенсибилизаторам таким как доксорубин, таксол или 17AAG. Это вызванное нагревом усиление цитотоксичности (т.е. термо-радиосенсибилизация) проявлялось в МТТ-тесте, в интенсификации апоптоза и в падении клоногенного потенциала. Степень такой радиосенсибилизации прямо коррелировала с температурой и продолжительностью примененной гипертермии: максимальное (в 40-50 раз) подавление клоногенности облученных клеток MCF-7/MDR1 обычно наблюдалось после самых длительных (60-90 мин) экспозиций при 44-45 °С, когда значения ФИД могли превышать 3,5. Однако и применение относительно мягких условий гипертермии (30-60 мин при 42-43 °С) тоже достаточно сильно (приблизительно в 5-20 раз) снижало клоногенный потенциал клеток MCF-7/MDR1, и значения ФИД в этих случаях доходили до 2-2,5.

На молекулярном уровне термо-радиосенсибилизация обусловлена протеотоксическими эффектами гипертермии, когда термолабильные белки массово денатурируют и агрегируют в прогретой клетке, что нарушает ее механизмы радиопротекции [4]. Характерной клеточной реакцией на любое протеотоксическое воздействие является так называемый «Heat Shock Response» - стресс-ответ, во время которого активированный транскрипционный фактор HSF1 запускает экспрессию

индуцибельных генов семейства *HSP* [5]. Анализ изменения экспрессии генов *HSP* показал, что транскрипционный стресс-ответ на гипертермию в первые часы после прогрева протекает сходным образом и в химиочувствительных клетках MCF-7, и в химио- и радиорезистентных клетках MCF-7/MDR1, что подтверждает как термочувствительность последних, так и возможность радиосенсибилизировать их с помощью нагрева.

Важно отметить, что радиосенсибилизирующие эффекты, которых удавалось достичь на MCF-7/MDR1 клетках с помощью гипертермии, были вполне сравнимы с эффектами, получаемыми на MCF-7 клетках, обработанных перед облучением известными «фармакологическими» радиосенсибилизаторами (доксорубицин, таксол или 17AAG).

Во всех исследованных комбинациях разных доз, температур и временных экспозиций гипертермическая обработка культур опухолевых клеток перед их облучением оказывала более сильное радиосенсибилизирующее действие, чем аналогичная гипертермия, проводимая на клетках после их облучения.

Обсуждение

Данное исследование показало, что гипертермия вызывает протеотоксический стресс в MCF-7/MDR1 клетках, который затем приводит к усилению пост-радиационного апоптоза и падению клоногенности – благодаря этому наблюдается феномен термо-радиосенсибилизации. Поскольку множественная лекарственная устойчивость и радиорезистентность опухолей являются серьезнейшими проблемами при лечении рака, комбинация гипертермии и облучения представляется весьма эффективным способом терапевтического воздействия на такие опухоли. Транскрипционный стресс-ответ, степень протеотоксичности теплового воздействия, уровень экспрессии и функциональная активность внутриклеточных белков теплового шока (*HSP*) могут существенно влиять на эффективность термо-радиосенсибилизации опухолей, и эти эндогенные факторы следует учитывать для разработки протоколов и схем комбинированной терапии.

Выводы:

1. Тепловой стресс оказывает радиосенсибилизирующее действие на раковые клетки с радио- и химиорезистентным фенотипом;
2. Гипертермия может применяться для преодоления радиорезистентности опухолей, невосприимчивых к фармакологическим радиосенсибилизаторам.

Список литературы

1. Datta N.R., Ordonez S.G., Gaipl U.S. [et al.] Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: recent advances and promises for the future // *Cancer Treat. Rev.* 2015. Vol. 41, № 9. P. 742-753.
2. Kabakov A.E., Gabai V.L. Cell death and survival assays // *Methods Mol. Biol.* 2018. Vol. 1709. P. 107-127.
3. Schmittgen, T.D. and Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method // *Nature protocols.* 2008. Vol. 3, №.6. p. 1101-1108
4. Кабаков А.Е., Кудрявцев В.А., Хохлова А.В. [и др.] Апоптоз в опухолевых клетках, подвергнутых сочетанному действию гипертермии и облучения: исследование молекулярных механизмов и мишеней // *Радиация и риск.* 2018. Т. 27. № 2. С. 62-75.
5. Chatterjee S., Burns T.F. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach // *Int J Mol Sci.* 2017. Vol. 18, № 9. pii: E1978.

PROTON BORON CAPTURE THERAPY: NOVEL APPROACH TO PROTON THERAPY

Pavel Bláha^{1,2}, *Lorenzo Manti*^{1,2}, *Chiara Feoli*², and the NEPTUNE collaboration

¹Laboratory of Radiation Biophysics, Department of Physics, University of Naples Federico II, Naples, Italy; ² INFN Naples section, Naples, Italy

pavel.blahax@gmail.com

Summary. Clinical proton therapy (PT), as a modern approach to cancer treatment, has been rapidly growing in the last years. To improve the PT capabilities to treat radioresistant cancers, this work focuses on a nuclear fusion reaction between protons and ^{11}B , $p^+ + ^{11}\text{B} \rightarrow 3\alpha$. The created high-LET alpha particles can cause highly localized clustered DNA damage that is usually lethal for the cells. This Proton-Boron Capture Therapy has the potential to further improve treatment efficacy while sparing the healthy tissue.

Key words: proton therapy enhancement, proton-boron fusion reaction, biological effects of charged particles, radioresistant tumour treatment

Introduction. Treatment of cancer is a complex process involving several approaches: from physical removal (surgery), chemotherapy to immunotherapy or radiation therapy. In the last years, clinical proton therapy (PT) has been rapidly growing [1], given the much-improved precision in targeting tumour and sparing of normal tissue allowed by the proton physical properties. This is due to the inverse dose-depth deposition along the Bragg curve, allowing for superior irradiation of deep-seated tumours and helping to differentiate the tumour from the organs at risk in its vicinity. This dosimetric advantage of protons is particularly important for pediatric cancer patients, where the risks of secondary cancers, arising from the integral dose absorbed by healthy tissue, are increased due to the long-life expectancy and therefore it has to be minimized at all costs.

Despite the aforementioned advantages, PT is not considered amenable to treat radioresistant cancers. The biological outcome of irradiation depends on the physical pattern of energy deposition – cellular lethality from induced damage increases with increasing ionization density, mainly due to the clustering of DNA lesions. Clinical proton RBE is universally considered to be 1.1, i.e. close to that of photon/electron, while in reality the RBE is dependent on several parameters. PT is therefore continuously being enhanced and new approaches developed. Apart from the evolving technological upgrades allowing for more narrow energy band deposition to the treated volume, other approaches are studied as well, e.g.: use of nanoparticles, proton minibeam radiation therapy, or the binary nuclear fusion approaches.

The lastly named modality uses the nuclear reaction between the incident proton beam and atoms added to the cells/tissue/tumour. One of the proposed nuclear fusions with a possible clinical usefulness is the reaction between low-energy protons and the boron-11 isotope. This fusion reaction, $p^+ + ^{11}\text{B} \rightarrow 3\alpha$, can be followed by two types of decays as described in Becker et al. [2]. This approach was termed Proton Boron Capture Therapy (PBCT) and the enhancement in proton effectiveness was predicted theoretically as well: [3,4]. Experimental verification of the PBCT effectiveness on mammalian cell cultures is the main topic of our study and is conducted within the NEPTUNE collaboration framework.

Materials and methods. Prostate cancer cell line DU-145 was used to assess the survival fractions after irradiation (clonogenic assay); preliminary experiments were conducted also using the human pancreatic cancer cells PANC-1. The radiation-induced chromosome aberrations (CA) were measured in prematurely condensed chromosomes (PCC), labelled using the FISH and multicolour-FISH (mFISH) techniques, from normal mammary epithelial cells MCF-10A.

Sodium mercaptododecaborate ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$, “BSH”), containing natural occurring boron, which has around 80 % of boron-11, was chosen as the boron carrier. Final concentrations of ^{11}B were 40 and 80 ppm (corresponding to 0.08 and 0.17 mg/ml of BSH respectively). The cells were treated with BSH (dissolved in medium) 6 – 8 hours before irradiation. The cell samples were irradiated at the INFN-LNS, Catania, Italy with 62 MeV protons and at the hadron therapy centre CNAO, Pavia with up to 230 MeV protons. In both cases, the cells were irradiated in various positions along the Spread-Out Bragg Peak (SOBP). To compare results to standard radiation, 250 kV X-ray radiogen machine by Siemens located at the University of Naples Federico II was used.

Results and discussion. The first experimental results showing the increased effectiveness of proton therapy were recently published by Cirrone et al. [5]. Clonogenic assay was conducted using the DU-145 cells in order to estimate the rate of cell killing enhancement due to the proton-boron fusion reaction. The cells were irradiated in the middle of the SOBP (estimated LET ~ 5 keV/ μm) at LNS, Catania (initial proton energy = 62 MeV), using 40 and 80 ppm ^{11}B pre-treatment. The BSH treated cells showed higher radiosensitivity (and thus lower survival) when compared to the untreated cells irradiated with the same dose of p^+ . The survival fraction (SF) dependences on dose were best fitted using the linear-quadratic function ($\text{SF} = \exp(-\alpha\text{D}-\beta\text{D}^2)$), the SF of BSH treated cells had completely exponential character. For illustration, the alpha parameters of measured dependences: X-ray – 0.222 ± 0.062 ($\beta = 0.064 \pm 0.014$); p^+ no BSH – 0.314 ± 0.022 ($\beta = 0.035 \pm 0.007$); p^+ 40 ppm ^{11}B – 0.614 ± 0.069 ; p^+ 80 ppm ^{11}B – 0.705 ± 0.033 . As can be seen, boron concentration dependence was observed; however, not statistically significant. BSH at the used concentrations had no effect on the plating efficiency of DU-145 cells.

The 3 alpha particles, released as a result of the proton-boron fusion, have the average energy estimated between 3 and 4 MeV [4]. These energies translate to the maximal ranges of approximately 18 – 27 μm , which corresponds quite well with the typical size of the cell. Therefore, the PBCT can be effective even if the boron is not metabolized inside of the cell, but only present on the membrane – the alpha particle range should be sufficient to reach the nucleus (DNA) and have a dramatic biological effect. The maximum value for the p-B reaction cross section occurs at around 675 keV. The proton mean energy decreases along the SOBP and therefore the fusion probability should increase. To test this hypothesis DU-145 cells were irradiated in several positions along the SOBP. Namely at the entrance of the beam, in the middle of SOBP (data reported above), and at the very distal end of SOBP. It was found that the cell killing increases with the distance within SOBP (from entrance to distal position), confirming the presumption that the biological effect enhancement is due to the p-B fusion reaction. At the distal position, fitted linear-quadratic function parameters increased for both cases – only protons ($\alpha = 0.541 \pm 0.027$) as well as protons + BSH ($\alpha = 0.952 \pm 0.053$). Importantly, no BSH enhancing effect was seen at the entrance of the beam – increasing the probability of future use of PBCT in practice due to the action only in the intended volume (tumour) and sparing the healthy tissue lying in front of it.

One of the well-known markers of ionizing radiation is the induction of CA. The complexity of CA depends on the locally absorbed dose which increases with LET of the used radiation creating clustered DNA damage. Such damage would be expected from alpha particles with fairly low energy, e.g. those released during the p-B reaction. It was observed that the total number of CA in MCF-10A cells (measured as exchanges between chromosome 1 and 2, labelled using the FISH method) after irradiation was significantly higher when the cells were treated with BSH (e.g. for 2 Gy and 80 ppm of ^{11}B , from 0.11 to 0.20 aberrations per cell = about 80 % increase). The use of m-FISH allowed to analyse the whole karyotype resulting in higher sensitivity and higher frequency of aberrations (e.g. for 2 Gy and 80 ppm of ^{11}B , the number of aberrations per cell increased to 0.22 and 0.47, with and without BSH

respectively = increase of about 114 %). The BSH treatment without irradiation had no effect on the number of CA, obtained with FISH or m-FISH. Significant differences were found in the case of complex CA (involving at least 2 chromosomes with 3 breaks in them) in the BSH treated and non-treated cells. For example, the number of complex CA per cell after 0.5 Gy of protons was around 0.004, but increased to approximately 0.026 with the use of boron carrier. The number of complex CA increased significantly with dose, still keeping a substantial difference between the cells without and with BSH: 0.08 and 0.18 respectively after 4 Gy. These results point, again, to the effect of high-LET alpha particles released during the proton-boron interaction.

Conclusion

- Enhancement of clonogenic cell death of BSH treated DU-145 cells after proton irradiation (both 40 and 80 ppm of ^{11}B)
- PBCT enhancement effect strongly dependent on energy of the incident protons
- Significantly higher number of complex CA induced in MCF-10A cells by the presence of boron carrier during p^+ exposure
- Tentative results point to the $p^+ + ^{11}\text{B} \rightarrow 3\alpha$ explanation of the observed effects – release of highly damaging high-LET alpha particles

The PBCT approach may be a very promising way to overcome the radioresistance of some types of tumours in a similar way as with the use of heavier ions (e.g. ^{12}C) without the difficulties of the latter, such as high cost, nuclear fragmentation, and radiobiological uncertainties regarding late toxicity. If successful, the PBCT research on cell cultures could pave the way to the pre-clinical stage of development and testing on *in vivo* tumours in small laboratory animals, which is one of the many steps to clinical usage. If proved correct, the consequent socio-economic benefits would be vast.

Future research. The research of PBCT, within the NEPTUNE collaboration, will continue by verifying the so far obtained results on different cell cultures. It is planned to also use different boron carriers apart from BSH – for example boronophenylalanine (BPA) is known to enter the cell better than BSH and should be tested. Test with monoenergetic low-energy proton beams (as close to the 675 keV cross section maximum as possible), could further prove the observed enhancement is caused by the $p^+ + ^{11}\text{B} \rightarrow 3\alpha$ reaction. One of the modern approaches would be the combination of PBCT with the ultra-high dose rate, FLASH, therapy – allowing for higher eradication of tumours and at the same time for higher sparing of the healthy tissue. If successful, it is planned to slowly transition to animals and *in vivo* tumours with the ultimate target being the start of clinical trials.

References

- [1] X. Tian, K. Liu, Y. Hou, et al., The evolution of proton beam therapy: Current and future status (Review), *Mol. Clin. Oncol.* (2017) 15–21. doi:10.3892/mco.2017.1499.
- [2] H.W. Becker, C. Rolfs, H.P. Trautvetter, Low-energy cross sections for $^{11}\text{B}(p, 3\alpha)$, *Zeitschrift Fur Phys. A At. Nucl.* 327 (1987) 341–355. doi:10.1007/BF01284459.
- [3] D.-K. Yoon, J.-Y. Jung, T.S. Suh, Application of proton boron fusion reaction to radiation therapy: A Monte Carlo simulation study, *Appl. Phys. Lett.* 105 (2014) 223507. doi:10.1063/1.4903345.
- [4] J.-Y. Jung, D.-K. Yoon, B. Barraclough, et al., Comparison between proton boron fusion therapy (PBFT) and boron neutron capture therapy (BNCT): a Monte Carlo study, *Oncotarget.* 8 (2017) 39774–39781. doi:10.18632/oncotarget.15700.
- [5] G.A.P. Cirrone, L. Manti, D. Margarone, et al., First experimental proof of Proton Boron Capture Therapy (PBCT) to enhance protontherapy effectiveness, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1141. doi:10.1038/s41598-018-19258-5.

MATHEMATICAL EVALUATION OF ROBUSTNESS OF IMPT PLANS

*V. Vondracek^{1,2}, J. Kubes^{1,2}, M. Andrlík^{1,2}, M. Navrátil^{1,2}, J. Rosina^{2,3},
A. N. Grebenyuk⁴*

¹ Proton Therapy Center Czech, Prague, Czech Republic

² Department of Health Care Disciplines and Population Protection, Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, Kladno, Czech Republic

³ Department of Medical Biophysics and Informatics, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

⁴ Department of Health Protection and Disaster Medicine, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author: Vladimir Vondracek, vladimir.vondracek@ptc.cz

Summary. Intensity modulated proton therapy allows to achieve very conformal irradiation with steep dose gradients and superb sparing of surrounding critical structures together with acceptable volume of low dose bath. The price for this advantage is high sensitivity to any uncertainty in patient setup and any deviation from localisation geometry. This sensitivity is usually defined as plan robustness. During treatment plan preparation influence of uncertainties is simulated and the result is evaluated usually in the means of acceptability of non-ideal dose distribution. Presented work is trying to develop formal frame to evaluate plan robustness by mathematical formalism used on simulated perturbed dose scenarios. Result should be in a form of tool that present overall risk of overdosage of critical structures and underdosage of target volumes for particular treatment plan. This tool can be used to accept or reject this plan for actual patient treatment.

The work was supported from European Regional Development Fund-Project " Engineering applications of microworld physics" (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000766)"

Key words: IMPT, proton therapy planning, plan robustness

Literature:

1. Albertini F, Bolsi A, Lomax AJ, Rutz HP, Timmerman B, Goitein G. Sensitivity of intensity modulated proton therapy plans to changes in patient weight. *Radiother Oncol.* 2008;86:187–94.
2. Chen W, Unkelbach J, Trofimov A, Madden T, Kooy H, Bortfeld T, Craft DL. Including robustness in multi-criteria optimization for intensity-modulated proton therapy. *Phys Med Biol.* 2012;57:591–608.