

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИНДУКЦИИ И РОСТА ОПУХОЛЕЙ У МЫШЕЙ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ТОНКИМ СКАНИРУЮЩИМ ПУЧКОМ ПРОТОНОВ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА *EX VIVO* И *IN VIVO*

© 2024 г. О.М. Розанова*, #, Е.Н. Смирнова*, Т.А. Белякова**, ##, Н.С. Стрельникова**, А.В. Смирнов**

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московская область, 142290, Россия

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

**Филиал «Физико-технический центр» Физического института им. П.Н. Лебедева РАН, ул. Мира, 1Н, Протвино, Московская область, 142281, Россия

##E-mail: belyakovata@lebedev.ru

Поступила в редакцию 19.12.2023 г.

После доработки 19.12.2023 г.

Принята к публикации 17.01.2024 г.

Исследованы закономерности индукции и роста опухолей у мышей при однократном облучении пучком протонов в дозах 30, 60 и 80 Гр клеток асцитной карциномы Эрлиха в условиях *ex vivo* и *in vivo*. Показано, что частота индукции опухолей после облучения протонами клеток асцитной карциномы Эрлиха в дозе 30 Гр при облучении *ex vivo* была ниже, чем после облучения *in vivo*, а при дозах 60 Гр и 80 Гр число опухолей было одинаковым. Временные закономерности возникновения опухолей при облучении клеток асцитной карциномы Эрлиха *ex vivo* значительно отличались от таковых при облучении опухоли *in vivo*: период времени, в течение которого регистрировалось появление новых опухолей, в группах *ex vivo* был одинаковым для всех исследованных доз, а при облучении опухолей *in vivo* этот интервал зависел от величины дозы. Скорость роста опухолей после облучения клеток *ex vivo* и *in vivo* не зависела от дозы, условий облучения и времени их возникновения, но была значительно ниже, чем в контрольных необлученных группах. Полученные результаты представляют интерес для понимания механизмов реализации потенциально летальных повреждений опухолевых клеток, роли микроокружения опухоли в индукции рецидивов и способов их преодоления с использованием потенциала протонной терапии, а также для разработки биомедицинских моделей для поиска оптимальных мишеней для адронной терапии рака.

Ключевые слова: протоны, асцитная карцинома Эрлиха, *ex vivo*, *in vivo*, мыши, рост опухоли.

DOI: 10.31857/S0006302924010172, EDN: QURKGC

В последнее десятилетие во всем мире интенсивно развиваются центры лучевой терапии, оснащенные установками для протонной терапии опухолей. Протонная терапия особенно подходит в тех случаях, когда альтернативные методы лечения не обеспечивают адекватного эффекта, а традиционная лучевая терапия представляет высокий риск для пациента. Более 250 тыс. пациентов получили протонную терапию, которая с успехом применяется для лечения как наиболее распространенных, так и редких видов рака. Применение протонной терапии оказалось особенно эффективным при терапии опухолей головного мозга, головы и шеи, а также в педиатрии [1, 2]. В

нашей стране в последние годы начали работать несколько радиологических центров, в которых используются отечественные и зарубежные установки для протонной терапии. В протонной терапии используется основное физическое преимущество ускоренных высокоэнергетических частиц, а именно специфическое распределение поглощенной дозы: относительно низкая энергия частиц на входе в биологическую ткань и наличие пика Брэгга, при котором происходит максимальное энерговыделение в конце пробега частицы на заранее заданной глубине, непосредственно в опухоли, а затем резкое падение энергии до нуля, что позволяет не повреждать окружающие здоровые ткани [3]. В медицинских центрах при протонной терапии опухолей применяют два основных способа формирования дозовых полей

Сокращения: АКЭ – формы асцитной карциномы Эрлиха, ОСК – опухолевые стволовые клетки.

для равномерного облучения всего объема мишени: пассивное рассеяние пучка и сканирование тонким (карандашным) пучком. При сканировании пучок протонов движется точно по объему мишени, заполняя весь облучаемый объем пиком Брэгга с одновременной модуляцией его интенсивности в процессе движения. Этот метод по сравнению с пассивным рассеянием обеспечивает лучшую трехмерную конформацию дозы, что снижает дозовые нагрузки на окружающие здоровые ткани и не требует подготовки специальных компенсаторов и коллиматоров для конкретного пациента, что сокращает сроки и стоимость лечения [4].

В клиниках при конвенциональной лучевой терапии используется фракционированное облучение в дозе 1.5–2.0 Гр при суммарной очаговой дозе 40–80 Гр. При этом противоопухолевая эффективность оценивается для пациентов по кратко- и долгосрочным критериям (подавление роста первичной опухоли, кожные лучевые реакции, частота рецидивирования, продолжительность жизни, острые и хронические токсические эффекты). Несмотря на совершенствование методов лучевой терапии у значительной части пациентов наблюдаются рецидивы, вторичные опухоли или формирование резистентности к терапии [5], в связи с чем использование протонной терапии открывает новые возможности для исследования причин рецидивирования и их предотвращения. Многими специалистами, в том числе и нами, высказывается мнение, что наиболее перспективным направлением, в котором возможно максимально использовать преимущества сканирующего пучка протонов в лучевой терапии является разработка и применение схем гипофракционирования или даже применения одно-двукратного высокодозового фракционного облучения. За последние 10 лет было проведено несколько клинических исследований по гипофракционированной протонной терапии, в которых наиболее распространенными областями лечения были простата, легкие и печень [6]. В работе [7] 200 пациентов с раком предстательной железы на ранней стадии были облучены тонким сканирующим пучком протонов пятью фракциями с суммарной очаговой дозой 36,25 Гр, среднее время наблюдения составило 36 месяцев. Рецидивы наблюдались только у 4% пациентов и не было выявлено токсичности 3-й степени и выше (по шкале токсичности Национального института рака CTCAE ver. 4.0). В другой работе [8] было показано, что при проведении умеренного гипофракционированного облучения опухолей у пациентов с раком предстательной железы сокращение числа фракций протонной терапии с 36–40 до 20–28 при одинаковой суммарной очаговой дозе не вызывало рецидивирования в зоне облучения в течение 6 месяцев и токсических реакций 3-й и 4-й степеней. Более высокие показатели

выживаемости пациентов по сравнению с конвенциональной лучевой терапией наблюдались и через несколько лет после протонной терапии с использованием гипофракционирования. В работе [9] после облучения пациентов с раком печени протонами в дозе 7 Гр за фракцию трехлетняя выживаемость без прогрессирования опухоли составила 95.2% на фоне отсутствия острой токсичности, а общая выживаемость — 86.4%. При исследовании гипофракционированного облучения в дозе 6 Гр за фракцию у пациентов с немелкоклеточным раком легкого общая выживаемость через 5 лет составила 50% и только у 9% наблюдалась поздняя токсичность 3-й степени [10].

В связи с этим для дальнейшей отработки схем гипофракционированного облучения опухолей многими исследователями отмечается необходимость поиска и разработки биомедицинских моделей, приближенных к условиям *in vivo*, которые бы максимально учитывали такие специфические особенности взаимодействия высокоэнергетических заряженных частиц с живой материей, как возможность эскалации дозы и мощности в точно локализованном объеме и низкую зависимость от содержания кислорода в тканях. Кроме того, в последние годы накопились новые данные о причинах и механизмах индукции опухолей, влияния микроокружения, иммунного ответа на разных стадиях терапии опухоли [11], которые открывают возможности для поиска принципиально других мишеней для улучшения терапии. Если традиционно в лучевой терапии приоритетом являлись повреждение ДНК и гибель опухолевых клеток, то сейчас обсуждается существенная роль микроокружения опухоли, иммунный опухолевый ответ, участие гипоксических областей опухоли и эффекта свидетеля в гибели опухолевых и нормальных клеток, поддерживающих структуру опухоли, что не только определяет противоопухолевую эффективность лечения, но и более успешно решает проблемы первичной радиорезистентности и рецидивирования. Ранее нами на модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей была показана возможность олиго- и гипофракционированного облучения опухолей протонами в дозах 30, 40, 60, 80 Гр, которые не только полностью подавляли рост первичной опухоли, но и снижали частоту рецидивирования этой опухоли, увеличивая среднюю и максимальную продолжительности жизни [12].

Большинство видов рака возникают и прогрессируют в результате трансформации и клональной экспансии опухолевых стволовых клетки (ОСК). ОСК представляют собой класс плюрипотентных клеток, которые присутствуют в большинстве типов рака человека, включая рак груди, головы и шеи, печени и крови. На опухолевых моделях было показано, что ОСК участвуют в развитии, инвазии и метастазировании, обладая при этом способностью к устойчивому самооб-

новлению. ОСК, в отличие от опухолевых и неопухолевых клеток, входящих в структуру опухоли, также проявляют повышенную устойчивость к химио- и радиотерапии за счет специфических поверхностных маркеров, профилей генной экспрессии, интенсивного удаления лекарственных препаратов и механизмов репарации [13]. Радиорезистентность ОСК рассматривается в качестве одной из причин рецидивирования онкологических заболеваний после радиотерапии. ОСК отличаются экстремальной устойчивостью к апоптозу, поэтому даже после высокодозной лучевой или цитотоксической терапии в этих клетках стимулируется репарация повреждений ДНК и способность к делению [14]. Показано, что гибель опухолевых клеток растет с увеличением дозы рентгеновского излучения в диапазоне 2–10 Гр, тогда как для ОСК происходит стимулирование деления с увеличением дозы, что приводит к развитию индуцированной радиорезистентности опухоли [15]. Закономерности и механизмы воздействия протонов на эту популяцию клеток *in vitro* изучены недостаточно, а данные часто противоречивы. В работе [16] обнаружена более высокая чувствительность ОСК немелкоклеточного рака легкого к облучению протонами по сравнению с фотонами. В другой работе не было обнаружено существенных изменений относительного количества ОСК при облучении двух клеточных линий рака молочной железы пучками нейтронов, протонов или их сочетанном действии в суммарной равноэффективной дозе 4.0 Гр [17].

Данных о радиобиологических характеристиках ОСК, полученных при действии фотонов или ускоренных частиц на опухоли в условиях *in vivo*, практически нет. Это связано со сложностью идентификации и локализации ОСК в структуре солидных опухолей. Экспериментальные результаты о действии протонов на ОСК в составе опухолей свидетельствуют о специфическом действии протонов по сравнению с фотонами [18]. Накопление таких данных ограничивается небольшим количеством источников протонов в мире, поскольку большинство ускорителей находится на территории медицинских центров, что не позволяет проводить систематические радиобиологические эксперименты.

Предполагая, что основной причиной рецидивирования опухолей является сохранение ОСК, крайне интересно было сравнить закономерности индукции опухолей у мышей после облучения *ex vivo* асцитных клеток карциномы Эрлиха и в составе солидной опухоли в дозах, равных или выше суммарной очаговой дозы при традиционной лучевой терапии, в короткие и отдаленные сроки после облучения.

Целью данной работы являлось изучение закономерностей индукции и роста опухолей у мышей при однократном облучении пучком прото-

нов в высоких дозах клеток карциномы Эрлиха *ex vivo* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах мышей колонии SHK (массой 31–35 г), полученных из питомника животных «Столбовая» НЦ ФМБА РФ (Столбовая, Московская обл.), которых содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино, Московская обл.) [19]. В качестве модели опухоли была выбрана солидная форма АКЭ [20]. Линия опухолевых клеток получена в ФГБУН «РНЦ им. Н.Н. Блохина» (Москва, Россия). Клетки АКЭ поддерживали *in vivo* в форме асцита у мышей SHK путем серийной внутрибрюшинной инокуляции с интервалом 7–9 суток. У животных в асцитических условиях извлекали асцитную жидкость и трижды промывали фосфатно-солевым буфером с помощью центрифугирования при 500 об/мин в течение 5 мин. Затем с помощью красителя трипанового синего в камере Горяева оценивали жизнеспособность клеток АКЭ, которая составляла не менее 98%.

Для облучения *ex vivo* суспензию клеток АКЭ в концентрации $20 \cdot 10^6$ клеток/мл помещали в микропробирки типа «эппендорф» объемом 1.5 мл и облучали при комнатной температуре протонами в дозах 30, 60 и 80 Гр. В тот же день мышам внутримышечно вводили облученные клетки АКЭ в количестве $2 \cdot 10^6$ клеток в объеме 0.1 мл в бедро левой лапы. Мышам контрольной группы инокулировали такое же количество необлученных клеток АКЭ, суспензия которых подвергалась имитации условий облучения. Для облучения *in vivo* солидной АКЭ мышам внутримышечно вводили $2 \cdot 10^6$ клеток в бедро левой задней лапы. Облучение протонами в дозах 30, 60 и 80 Гр проводили на пятые сутки после инокуляции АКЭ при пальпации опухолевого узла у каждого животного. Для иммобилизации мышей на время облучения внутрибрюшинно вводили анестезирующую смесь золетила (0.7 мг/кг) и ксилазина (3.4 мг/кг). Контрольная группа включала необлученных мышей с опухолями, подвергавшихся транспортировке к источнику излучения, анестезии и имитации условий облучения. Для каждой серии экспериментов было проведено не менее двух повторов. Всего использовали 130 мышей, по 10 мышей в каждой группе.

Источником протонного излучения служил синхротрон в ЦКП «Прометеус» ФТЦ ФИАН (Протвино, Московская обл.). При облучении *ex vivo* микропробирку с суспензией клеток АКЭ помещали в водный фантом, проводили конусную лучевую томографию для определения облучаемого объема и в специально разработанной трехмерной планирующей системе составляли

Таблица 1. Количество мышей с опухолями после облучения протонами АКЭ *in vivo* и *ex vivo* в течение месяца

Доза	Количество мышей с опухолями, %									
	7-е сутки		14-е сутки		21-е сутки		28-е сутки		35-е сутки	
	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>
0 Гр	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
30 Гр	0	0	0	20	15	40	50	70	60	100
60 Гр	0	0	0	0	5	20	20	20	25	30
80 Гр	0	0	0	0	5	0	25	0	25	10

план облучения. Объем мишени ($V = 30.2 \pm \pm 0.1 \text{ см}^3$) был выбран в форме параллелепипеда с захватом окружающего пространства для гарантированного равномерного облучения всей суспензии клеток. Облучение планировали с одного направления методом сканирования по всему объему. Суспензию клеток в микропробирке облучали в модифицированном пике Брэгга с энергией протонов на выходе с ускорителя 84–101 МэВ. При облучении *in vivo* мышь фиксировали пластиковыми зажимами на платформе из полипропилена таким образом, чтобы облучаемая конечность была максимально удалена от тела, затем платформу наклонно погружали в водный фантом и получали томограмму опухоли. При составлении плана облучения использовали фактический объем опухоли, который в этом эксперименте равнялся $0.45 \pm 0.05 \text{ см}^3$. Данный объем был выбран на основе наших предыдущих работ [21, 22], где была показана более высокая противоопухолевая эффективность и значительное увеличение средней продолжительности жизни мышей при облучении фактического объема опухоли по сравнению с облучением большего, так называемого планируемого объема. Верификацию положения каждой мыши при облучении проводили с помощью лазерной системы позиционирования и съемки проекций с совмещением текущего положения мишени с исходным с точностью 1 мм. Облучение заданного объема проводили с двух полей тонким пучком протонов, энергия протонов на выходе с направления 0° оставляла 98–104 МэВ, с направления 180° — 96–100 МэВ, сигма пучка на входе в водный фантом составляла 2.8–3.6 мм. Облучение проходило в импульсном режиме с длительностью импульса 200 мс и цикличностью 1 импульс в 2 с. Равномерность дозы и размер поля контролировали с помощью радиометрической пленки ЕВТЗ, а поглощенную дозу — электрометром PTW Unidos webline с ионизационной камерой (PTW PinPoint 3D-Chamber 31022, PTW Freiburg GmbH, Германия). На уровне 95% изодозы однородность дозы составляла не менее 97%. Точность определения дозы в зоне облучения — 3%.

После облучения ежедневно наблюдали за частотой индукции солидных опухолей, динамикой и скоростью их роста. Дважды в неделю с помощью штангенциркуля у каждой мыши измеряли три ортогональных диаметра опухоли. Величину опухоли (в см^3) рассчитывали по формуле [23]: $\text{объем опухоли} = \pi/6 \cdot d_1 \cdot d_2 \cdot d_3$, где d_1 – d_3 — три ортогональных диаметра. Опухоль считали появившейся при достижении объема 0.40 см^3 . Скорость роста опухоли рассчитывали по двум параметрам — среднему относительному объему и среднему времени пятикратного увеличения, которое рассчитывалось как среднее количество дней от начала роста до увеличения объема в пять раз.

Статистическую оценку различий между группами, имеющими нормальное распределение, проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента; в остальных случаях использовался непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни. Для сравнения результатов эксперимента, где показатели выражались в долях, достоверность различий оценивали по критерию углового преобразования Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У 100% мышей контрольных групп при инокуляции необлученных клеток индуцировались солидные опухоли, объем которых достигал на 5-е сутки $\sim 0.4 \text{ см}^3$. Через 35 суток они достигали стандартного для этой модели опухолевого роста объема $\sim 8 \text{ см}^3$. В табл. 1 представлены результаты по регистрации частоты индукции опухолей у мышей после инокуляции облученных асцитных клеток и облучения солидных опухолей АКЭ в течение месяца. В группах мышей, которым были инокулированы облученные *ex vivo* клетки, появление опухолей наблюдали через 21 сутки после облучения, задержка начала роста не зависела от дозы облучения. В группе мышей, у которых опухоли локально облучали *in vivo* в дозе 30 Гр, первые опухоли пальпировались на 14-е сутки, при облучении 60 Гр — на 21-е сутки, а при дозе 80 Гр — на 35-е сутки. К концу первого месяца

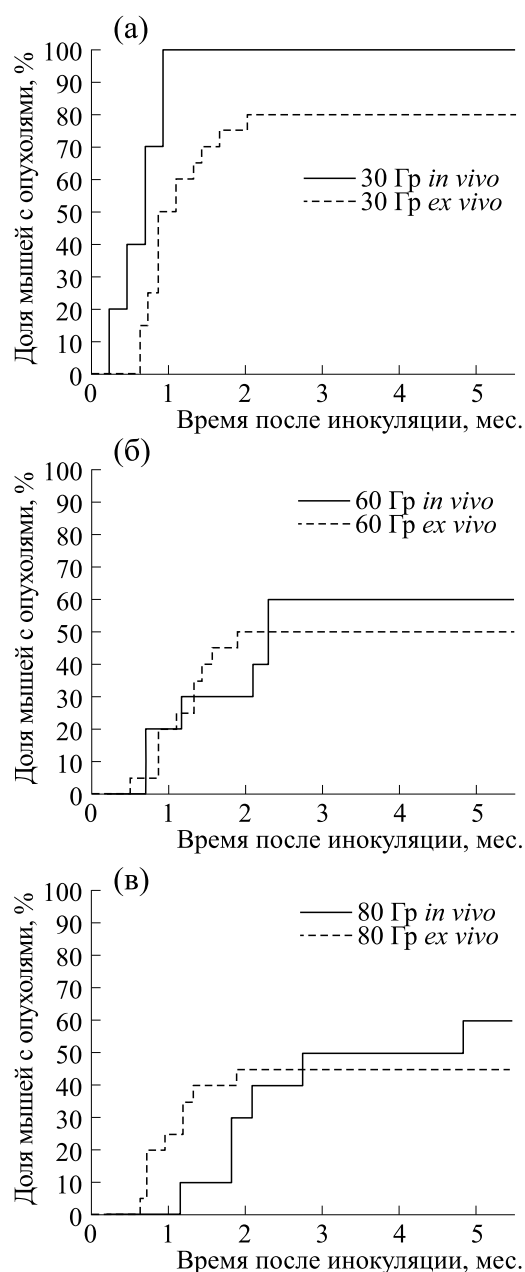


Рис. 1. Динамика индукции опухолей у мышей после облучения клеток АКЭ *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозах 30 Гр (а), 60 Гр (б) и 80 Гр (в).

при облучении асцитных клеток в дозе 30 Гр *ex vivo* опухоли были у 60% мышей, а после облучения солидных опухолей в дозе 30 Гр *in vivo* — у 100%. При облучении в дозе 60 Гр опухолевых клеток *in vivo* и *ex vivo* различий в частоте индукции опухолей не наблюдали, а при дозе 80 Гр *ex vivo* опухоли были у 25% мышей, в отличие от условий *in vivo*, где опухоли пальпировались у 10%. При облучении клеток *ex vivo* латентный период появления первых опухолей в течение первого месяца не зависел от дозы и составил 21 сут-

ки, в отличие от облучения *in vivo*, где данный показатель зависел от дозы.

Таким образом, были обнаружены значительные различия в закономерностях индукции АКЭ после облучения в разных условиях как по частоте индукции опухолей в течение месяца, так и длительности латентного периода. Выявленные различия в динамике индукции опухолей демонстрируют влияние на радиочувствительность опухолевых клеток условий облучения. Более длительный интервал, необходимый для индукции рецидивов после облучения солидной АКЭ *in vivo* у мышей, по сравнению с динамикой возникновения АКЭ после введения облученных при тех же дозах асцитных клеток *ex vivo* можно объяснить тем, что облученные клетки имплантировались здоровым животным, а при облучении солидной АКЭ мыши уже являлись опухоленосителями и подвергались локальному облучению высокими дозами протонов, что индуцировало специфический воспалительный и иммунный ответ. Можно предположить, что при облучении высокими дозами суспензии клеток *ex vivo* и последующем «культивировании» в условиях *in vivo* происходят гибель большинства опухолевых клеток, отбор, выживание и стимулирование деления единичных клеток, что в конечном итоге приводит к рецидиву в отличие от последствий облучения солидной опухоли *in vivo*, состоящей из опухолевых и нормальных клеток, где наблюдались классические закономерности увеличения гибели клеток от дозы. Появление опухолей после инокуляции облученных асцитных клеток *ex vivo* в дозах, равных летальным или выше доз, определенных по критериям выживаемости опухолевых клеток или их колониеобразующей способности, служит еще одним аргументом о критической роли ОСК в рецидивировании опухолей после лучевой терапии и их высокой радиорезистентности [24]. В связи с этим мы поддерживаем мнение некоторых исследователей, что эффективность действия новых методов радиотерапии необходимо оценивать по их действию на ОСК [25]. Показано, что абсолютное количество ОСК увеличивается после однократного облучения рентгеновскими лучами в дозах 1–10 Гр в культурах опухолевых клеток. Если гибель опухолевых клеток растет с увеличением дозы облучения, то для ОСК происходит стимулирование деления, что приводит к развитию индуцированной радиорезистентности опухоли [26].

Далее следили за появлением опухолей на протяжении шести месяцев после облучения. На рис. 1 показана динамика появления опухолей у мышей после облучения клеток АКЭ *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозах 30–80 Гр.

Через шесть месяцев после облучения асцитных клеток в дозе 30 Гр опухоли индуцировались у 80% мышей, а после облучения солидных опухолей — у 100%. После облучения в дозе 60 Гр опу-

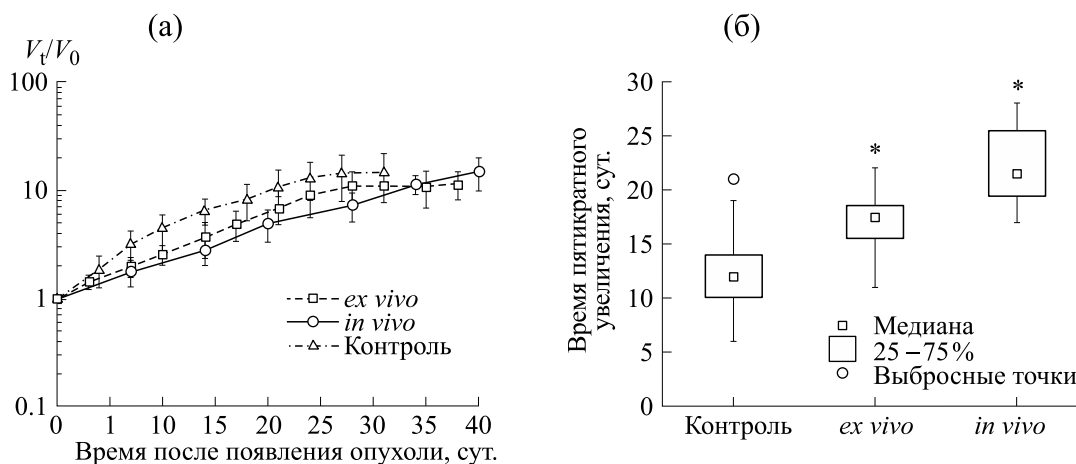


Рис. 2. Скорость роста опухолей у мышей после облучения опухолевых клеток *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозе 30 Гр: (а) — средние относительные объемы опухоли в зависимости от дней после появления опухоли; (б) — количество дней, необходимое для увеличения объема опухоли в пять раз по сравнению с первым измеренным объемом ($>0.40 \text{ см}^3$). Объемы нормализованы к первому измеренному объему ($>0.40 \text{ см}^3$). Статистическая значимость оценивалась с помощью U-критерия Манна–Уитни, * — различие достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.01$).

холевых клеток *ex vivo* и *in vivo* к этому моменту наблюдения частота опухолей была 50 и 60% соответственно, а при дозе 80 Гр *ex vivo* опухоли были у 45% животных и у 60% после облучения *in vivo*. Было показано, что при облучении клеток АКЭ *ex vivo* во всех группах опухоли появляются независимо от дозы в период от 21 до 61 суток после облучения. При облучении опухолей *in vivo* период возобновления роста зависел от величины дозы: при 30 Гр он составлял 14–35 суток, у 60 Гр — от 21–69 суток, а у 80 Гр — от 35 до 146 суток. Таким образом, при наблюдении за динамикой индукции опухолей в течение шести месяцев после облучения были найдены критические интервалы, в течение которых возникают или возобновляют рост опухоли: для условий *ex vivo* максимальный латентный период составил два месяца, а для *in vivo* — пять месяцев, что свидетельствует о влиянии условий облучения и микроокружения опухолей на возобновление роста опухоли. Полученные результаты еще раз демонстрируют высокий туморогенный потенциал и радиорезистентность ОСК АКЭ, поскольку наблюдалась индукция опухолей у здоровых мышей после облучения опухолевых клеток в сублетальных и летальных дозах.

В нашем исследовании после введения мышам суспензии *ex vivo* облученных асцитных клеток последующие процессы, влияющие на судьбу разных клеток, происходили в условиях организма со всеми факторами гибели опухолевых клеток, индуцированных воспалительных реакций организма, гипоксических условий в области роста опухоли, что является, на наш взгляд, полезной экспериментальной моделью для исследования условий микроокружения, влияющих на

индукцию и рост опухоли у животных. В исследованиях *in vitro* при определении радиочувствительности десятков линий опухолевых клеток показано, что многие виды раков являются радиорезистентными, что требует значительного повышения суммарной дозы лучевой терапии [13]. Модель солидной формы АКЭ на мышах, используемая в нашей работе, относится к агрессивному быстрорастущему типу опухоли, со 100% гибелью животных с появившимися опухолями в течение 35–40 суток. Поскольку мы использовали однократные дозы, равные или значительно выше сублетальных и летальных для опухолевых клеток, то выявленные закономерности свидетельствуют, что даже они недостаточны для полного отсутствия рецидивов, что требует дальнейшего поиска усиления действия протонов, возможно, с использованием ингибирования конкретных сигнальных и регуляторных каскадов.

У всех мышей с опухолями, индуцированными за все время наблюдения, измеряли скорость роста опухолей. У мышей контрольных групп *ex vivo* и *in vivo* скорость роста опухолей была одинаковой, что позволило нам суммировать эти данные. На рис. 2 представлена скорость роста опухолей у мышей после облучения опухолевых клеток *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозе 30 Гр. Было обнаружено, что скорость роста опухолей после облучения в дозе 30 Гр в обеих группах не отличалась и была значительно ниже, чем в контрольной. Среднее время пятикратного увеличения объема опухоли в группах при облучении клеток *ex vivo* (18.0 ± 4.4 сут.) достоверно не отличалось от *in vivo* (22.0 ± 4.1 сут.) в отличие от контрольной группы (12.0 ± 2.2 сут.).

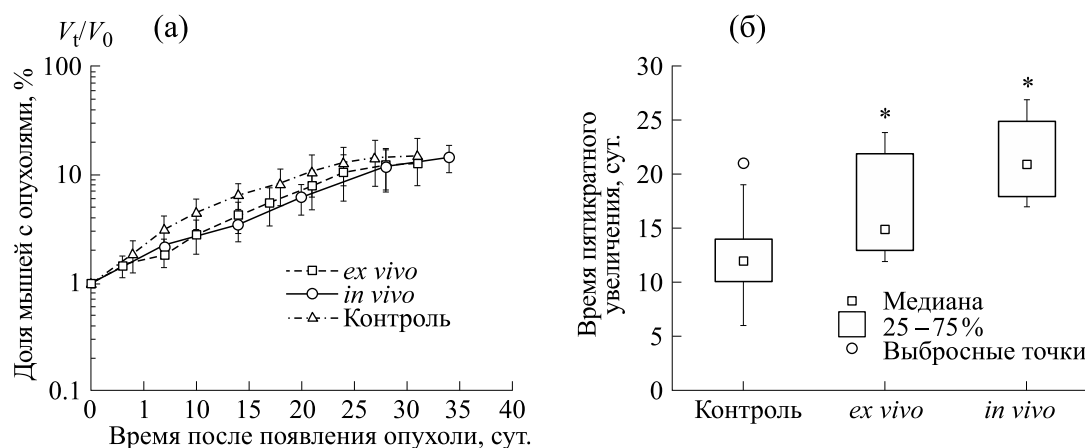


Рис. 3. Скорость роста опухолей у мышей после облучения опухолевых клеток *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозе 60 Гр: (а) — средние относительные объемы опухоли в зависимости от дней после появления опухоли; (б) — количество дней, необходимое для увеличения объема опухоли в пять раз по сравнению с первым измеренным объемом. Объемы нормализованы к первому измеренному объему ($>0.40 \text{ см}^3$). Статистическая значимость оценивалась с помощью *U*-критерия Манна–Уитни, * — различие достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.01$).

По результатам, представленным на рис. 3, видно, что скорость роста опухолей у мышей после облучения опухолевых клеток *ex vivo* и *in vivo* в дозе 60 Гр не отличалась, но опухоли росли гораздо медленнее, чем в контрольной группе. Среднее время пятикратного увеличения объема опухоли в группах при облучении *ex vivo* составило — 17.0 ± 4.3 сут., *in vivo* — 21.0 ± 2.6 сут., а в контроле — 12.0 ± 2.2 сут.

На рис. 4 представлена скорость роста опухолей у мышей после облучения клеток АКЭ *ex vivo* и *in vivo* в дозе 80 Гр. После появления опухолево-

го узла в месте инокуляции скорость роста опухоли в обеих группах достоверно отличалась от контрольной, при этом опухоли, облученные *in vivo*, росли медленнее, чем облученные *ex vivo*. Среднее время пятикратного увеличения объема опухоли в группах при облучении *ex vivo* составило 17.0 ± 2.2 сут., а *in vivo* — 22.0 ± 2.0 сут., т.е. только при самой высокой использованной дозе нам удалось наблюдать влияние условий облучения на скорость роста опухоли по этому показателю.

Таким образом, были обнаружены значительные различия как в частоте индукции опухолей в

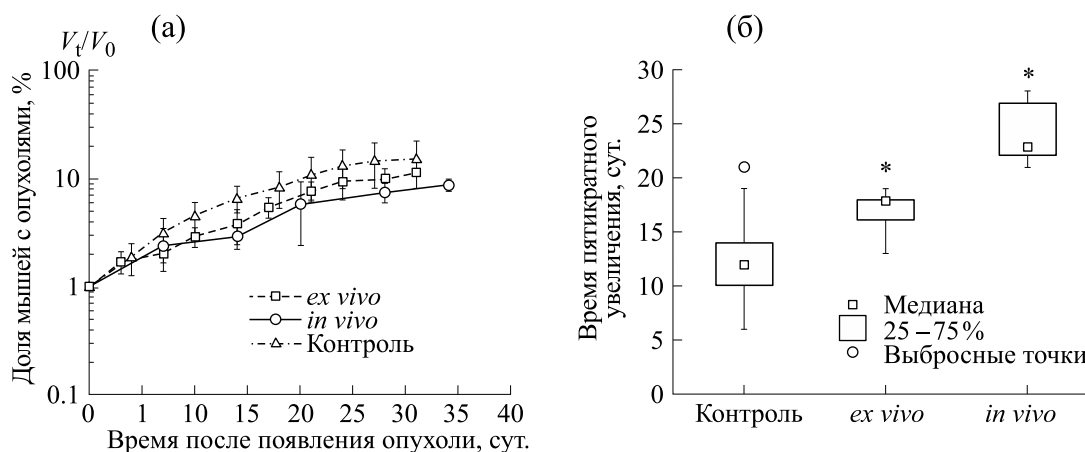


Рис. 4. Скорость роста опухолей у мышей после облучения опухолевых клеток *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозе 80 Гр: (а) — средние относительные объемы опухоли в зависимости от дней после появления опухоли; (б) — количество дней, необходимое для увеличения объема опухоли в пять раз по сравнению с первым измеренным объемом. Объемы нормализованы к первому измеренному объему ($>0.40 \text{ см}^3$). Статистическая значимость оценивалась с помощью *U*-критерия Манна–Уитни, * — различие достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.01$).

течение месяца, так и длительности латентного периода после облучения клеток *ex vivo* и *in vivo*. Более длительный интервал был необходим для индукции рецидивов после облучения солидной АКЭ *in vivo* у мышей по сравнению с динамикой возникновения АКЭ после трансплантации асцитных клеток, облученных *ex vivo* при тех же дозах. Скорость роста опухолей АКЭ после облучения клеток *ex vivo* и *in vivo* не зависела ни от дозы, ни от условий облучения, но значительно отличалась от контроля во всех группах ($p \leq 0.01$). Следует отметить, что во всех облученных группах скорость роста опухолей также не зависела от времени начала роста, т.е. не имело значения, появилась опухоль в течение первого месяца после инокуляции или через 6 месяцев. Можно предположить, что даже после облучения протопами асцитных клеток в дозах, сравнимых с общей очаговой дозой при радиотерапии (40–60 Гр), остается достаточное количество клеток и факторов, инициирующих рецидивы. Это может служить еще одним доказательством, что для развития опухоли достаточно нескольких клеток [27]. Мы предполагаем, что поскольку регистрируемые в нашей работе показатели опухолевого роста являются интегральным результатом гибели, задержки деления разных по радиочувствительности клеток опухоли, стимулирования дифференцировки и пролиферации ОСК в условиях влияния микроокружения опухоли и иммунитета организма, то предложенная экспериментальная модель может послужить полезным инструментом для решения проблем радиорезистентности и рецидивирования опухолей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность руководителю Центра коллективного пользования комплекса протонной терапии А.Е. Шемякову за помощь в проведении облучения в ЦКП «Прометеус» и дозиметрическое сопровождение экспериментов, а также чл.-корр. РАН В.Е. Балакину за инициирование данного исследования и обсуждение полученных результатов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-01025-23-01 при частичном финансировании из средств договора НИР № 28/22 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводили в соответствии с национальными и международными руководящими принципами медицинской этики, изложенными в этических принципах медицинских исследований с участием человека Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинская декларация, 2013). Протокол эксперимента (№ 36 от 15.03.2022) был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике, все процедуры проводились в соответствии с законами и правилами, касающимися испытаний на животных и гуманного обращения с ними.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blanchard P., Gunn G. B., Lin A., Foote R. L., Lee N. Y., and Frank S. J., Proton therapy for head and neck cancers. *Semin. Radiat. Oncol.*, **28** (1), 53–63 (2018).
2. Baliga S., Gandola L., Timmermann B., Gail H., Padovani L., Janssens G. O., and Yock T. I. Brain tumors: Medulloblastoma, ATRT, ependymoma. *Pediatric Blood & Cancer*, **68** (S2) (2020). DOI: 10.1002/pbc.28395
3. Tommasino F. and Durante M. Proton radiobiology. *Cancers* (Basel), **7**, 353–381 (2015).
4. Bortfeld T., Paganetti H., and Kooy H. M. Proton Beam Radiotherapy – The State of the Art. *Med. Phys.*, **32** (6), 2048–2049 (2005).
5. Warren J., Noone A., Stevens J., Wu X.-Ch., Hsieh M.-Ch., Mumphy B. J., Schmidt R., Coyle L., Shields R., and Mariotto A. B. The Utility of Pathology Reports to Identify Persons With Cancer Recurrence. *Med. Care* **60** (1), 44–49 (2022). DOI: 10.1097/MLR.0000000000001669
6. Santos A., Penfold S., Gorayski P., and Le H. The Role of Hypofractionation in Proton Therapy. *Cancers* (Basel) **14** (9), (2022). DOI: 10.3390/cancers14092271
7. Kubes J., Vondracek V., Andrlik M., Navrátil M., Sláviková S., Vítek P., Rosina J., Abrahámová J., Prausová J., Grebenyuk A., and Dědečková K. Extreme hypofractionated proton radiotherapy for prostate cancer using pencil beam scanning: Dosimetry, acute toxicity and preliminary results. *J. Med. Imaging Radiat. Oncol.* **63**, 829–835 (2019). DOI: 10.1111/1754-9485.12947
8. Гриценко С. Е., Удалов Ю. Д. и Киселев В. А. Оптимизация метода протонной лучевой терапии у больных раком предстательной железы, получающих лечение в ФГБУ ФНКЦРИО ФМБА России. В сб. матер. VI Всероссийского научно-образовательного конгресса «Онкорadiология, лучевая диагностика и терапия» (М., 2023), сс. 25–26.
9. Kim T. H., Park J.-W., Kim B. H., Oh E. S., Youn S. H., Moon S. H., Kim S. S., Woo S. M., Koh Y.-H., Lee W. J., and Kim D. Y., Phase II Study of Hypofractionated Proton Beam Therapy for Hepatocellular Carcinoma. *Front. Oncol.* **10**, 542 (2020). DOI: 10.3389/fonc.2020.00542

10. Kharod S. M., Nichols R. Ch., Henderson R. H., Morris Ch. G., Pham D. C., Seeram V. K., Jones L. M., Antonio-Miranda M., Huh S., Li Z., and Hoppe B. S. Image-guided hypofractionated double-scattering proton therapy in the management of centrally-located early-stage non-small cell lung cancer. *Acta Oncol.* **59** (10), 1164–1170 (2020). DOI: 10.1080/0284186X.2020.1759821
11. Di Maggio F. M., Minafra L., Forte G. I., Cammarata F. P., Lio D., Messa C., Gilardi M. C., and Bravatà V. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. *J. Inflamm.* (Lond.), **12**, 14 (2015). DOI: 10.1186/s12950-015-0058-3
12. Балакин В. Е., Белякова Т. А., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Шемяков А. Е. и Стрельникова Н. С. Использование модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей для исследования ранних и отдаленных последствий гипофракционированного протонного облучения. *Биомедицина*, **17** (3Е), 127–132 (2021). DOI: 10.33647/2713-0428-17-3Е-127-132
13. Olivares-Urbano M., Grinan-Lison C., Marchal J., and Núñez M. I. CSC Radioresistance: A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer. *Cells.* **9** (7), 1651 (2020). DOI: 10.3390/cells9071651
14. Skvortsov S., Debbage P., Lukas P., and Skvortsova I. Crosstalk between DNA repair and cancer stem cell (CSC) associated intracellular pathways. *Semin. Cancer Biol.*, **31**, 36–42 (2015).
15. Матчук О. Н., Замулаева И. А., Селиванова Е. И., Мкртчян Л. С., и Крикунова Л. И. Радиорезистентность опухолевых стволовых клеток — одна из ключевых проблем радиационной онкологии. *Исследования и практика в медицине*, **6** (1), 189 (2019).
16. Zhang X., Lin S. H., Fang B., Gillin M., Mohan R., and Chang J. Y. Therapy-resistant cancer stem cells have differing sensitivity to photon versus proton beam radiation. *J. Thorac Oncol.*, **8** (12), 1484–1491 (2013).
17. Matchuk O. N., Yakimova A. O., Saburov V. O., Koryakin S. N., Ivanov S. A., and Zamulaeva I. A. Effects of Combined Action of Neutron and Proton Radiation on the Pool of Breast Cancer Stem Cells and Expression of Stemness Genes In Vitro. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **173** (6), 749–753 (2022).
18. Dini V., Belli M., and Tabocchini M. A. Targeting cancer stem cells: protons versus photons. *Br. J. Radiol.*, **93** (1107), 20190225 (2020). DOI: 10.1259/bjr.20190225
19. Smith J. A., van den Broek F. A., Martorell J. C., Hackbarth H., Ruksenas O., and Zeller W. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of a FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments. *Lab. Anim.*, **41** (2), 143–160 (2007). DOI: 10.1258/002367707780378212
20. Mishra S., Tamta A. K., Sarikhani M., Desingu P. A., Kizkekra Sh. M., Pandit A. Sh., Kumar Sh., Khan D., Raghavan S. C., and Sundaresan N. R. Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy. *Sci. Rep.*, **8** (1), 5599 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-23669-9
21. Балакин В. Е., Шемяков А. Е., Заичкина С. И., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Романченко С. П., Сорокина С. С., Стрельникова Н. С. Гипофракционированное облучение солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей тонким сканирующим пучком протонов. *Биофизика*, **61** (4), 808–812 (2016).
22. Балакин В. Е., Шемяков А. Е., Заичкина С. И., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Романченко С. П., Сорокина С. С., Стрельникова Н. С. Отдаленные лучевые последствия после гипофракционированного облучения протонами солидной карциномы Эрлиха у мышей. *Биофизика*, **62** (1), 161–167 (2017).
23. Sorensen B., Horsman M., Alsner J., Overgaard J., Durante M., Scholz M., Friedrich Th., and Bassler N. Relative biological effectiveness of carbon ions for tumor control, acute skin damage and late radiation-induced fibrosis in a mouse model. *Acta Oncologica*, **54** (9), 1623–1630 (2015). DOI: 10.3109/0284186X.2015.1069890
24. Yang L., Shi P., Zhao G., Xu J., Peng W., Zhang J., Zhang G., Wang X., Dong Zh., Chen F., Cui H. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **5** (1), 8 (2020). DOI: 10.1038/s41392-020-0110-5
25. Замулаева И. А. Радиорезистентность популяции опухолевых стволовых клеток: механизмы, способы преодоления и клиническое значение. В сб. матер. Междунар. конф. «Актуальные проблемы радиационной биологии. К 60-летию создания Научного совета РАН по радиобиологии» (Дубна, 2022), сс. 35–38.
26. Замулаева И. А., Матчук О. Н., Селиванова Е. И., Андреев В. Г., Липунов Н. М., Макаренко С. А., Жаворонков Л. П., Саенко А. С. Увеличение количества опухолевых стволовых клеток под воздействием редкоизирующего излучения. *Радиационная биология. Радиоэкология*, **54** (3), 256–264 (2014). DOI: 10.7868/S0869803114030187
27. Quintana E., Shackleton M., Sabel M. S., Fullen D. R., Johnson T. M., and Morrison S. J. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, **456** (7222), 593–598 (2008).

Regularities of Induction and Growth of Tumors in Mice upon Irradiation of Ehrlich Carcinoma Cells *ex vivo* and *in vivo* with a Pencil Scanning Beam of Protons

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

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

***Branch "Physical-Technical Center" of P.N. Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences,
Mira st. 1H, Protvino, Moscow Region, 142281 Russia*

The patterns of tumor induction and growth in mice were studied under single irradiation with a proton beam at doses of 30, 60, and 80 Gy of Ehrlich carcinoma cells under *ex vivo* and *in vivo* conditions. It was shown that the frequency of tumor induction after proton irradiation of Ehrlich carcinoma cells *ex vivo* at a dose of 30 Gy was lower than after irradiation *in vivo*, and at doses of 60 Gy and 80 Gy, the number of tumors was the same. The temporal patterns of tumor occurrence during irradiation of Ehrlich carcinoma cells *ex vivo* differed significantly from *in vivo* irradiation: the period of time when the appearance of new tumors was recorded in the *ex vivo* groups was the same for all doses, and during *in vivo* irradiation it had a dose dependence. The growth rate of Ehrlich carcinoma tumors after cell irradiation *ex vivo* and *in vivo* did not depend on the dose, the method of irradiation, or the time of their occurrence, but was significantly lower than in the control group. The results obtained are of interest for understanding the mechanisms of manifestation of potentially lethal damage to tumor cells, the role of the tumor microenvironment in the induction of relapses and ways to overcome them using the potential of proton therapy, as well as for the development of biomedical models to search for optimal targets for hadron cancer therapy.

Keywords: protons, Ehrlich ascites carcinoma, ex vivo, in vivo, mice, tumor growth