

РЕЗУЛЬТАТЫ ФЛЭШ-ОБЛУЧЕНИЯ МЫШЕЙ *in vivo* ПРОТОНАМИ ВЫСОКОЙ ЭНЕРГИИ

© 2024 г. А.Е. Шемяков*, **, #, А.Р. Дюкина*, С.И. Заичкина*, А.В. Агапов***, Г.В. Мицын***, К.Н. Шипулин***

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

**Физико-технический центр Физического института РАН,
ул. Мира, 1Н, Протвино Московской области, 142280, Россия

***Объединенный институт ядерных исследований,
ул. Жолио-Кюри, 6, Дубна Московской области, 141980, Россия

#E-mail: alshemyakov@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.03.2024 г.

После доработки 22.08.2024 г.

Принята к публикации 23.08.2024 г.

Исследовано действие высокоэнергетического (660 МэВ) протонного облучения на ускорителе фазотрон во флэш-режиме (80 Гр/с) по сравнению со стандартной мощностью протонного воздействия 3.0 Гр/мин. При облучении в двух режимах в дозах 1.0 и 1.5 Гр оценивали индукцию цитогенетических повреждений в клетках костного мозга и состояние лимфоидных органов (тимус и селезенка), в дозах 7.0 и 8.0 Гр анализировали выживаемость при тотальном облучении мышей *in vivo*, а в дозах 40 и 60 Гр определяли скорость роста модельной опухоли при облучении *ex vivo*. Показано, что облучение животных во флэш-режиме в дозе 1.5 Гр защищает пролиферативную активность селезенки, а также приводит к снижению цитогенетических повреждений в эритроцитах костного мозга по микроядерному тесту по сравнению со стандартным режимом облучения в дозе 1.5 Гр, т.е. наблюдается более мягкое воздействие дозы флэш-режима. Однако облучение мышей во флэш-режиме в больших дозах (7.0 и 8.0 Гр) приводит к более ранней гибели животных по сравнению со стандартным режимом облучения. Только после флэш-облучения суспензии асцитной карциномы Эрлиха в дозе 40 Гр был сформирован опухолевый узел с дальнейшим ростом, во всех остальных группах опухоль не сформировалась.

Ключевые слова: протонное облучение, флэш-эффект, микроядра, асцитная карцинома Эрлиха, выживаемость, мыши.

DOI: 10.31857/S0006302924040197, EDN: NFERGZ

За последние несколько десятилетий произошло значительное улучшение качества лучевой терапии благодаря новым разработкам и технологиям, а также совершенствованию вычислительной техники. Одной из новых технологий стала протонная терапия. Данный вид дистанционной лучевой терапии с каждым годом становится доступнее для использования во многих странах мира. Одновременно с развитием и распространением этой технологии ученые и инженеры работают в поисках наиболее оптимальных условий для повышения ее эффективности, а также для снижения затрат на эксплуатацию дорогостоящего оборудования — протонных ускорителей. Одним из таких направлений стало исследование

доставки доз в режиме высокой мощности [1]. Воздействие на биологический объект высокоинтенсивных пучков протонов за сверхкороткий промежуток времени (длительностью до 100 мс) и следующие за этим биохимические процессы вызывают так называемый флэш-эффект. В последние годы использование сверхвысоких мощностей дозы интенсивно исследовалось как подход к снижению радиационного воздействия на здоровые ткани при сохранении контроля над опухолью [2, 3]. Чаще всего этот эффект можно наблюдать при мощности дозы более 50 Гр/с. В качестве объяснения наблюдаемого щадящего воздействия на здоровые ткани преобладает гипотеза истощения кислорода [4]. Облучение сверхвысокими мощностями дозы вызывает локальную нехватку кислорода, что приводит к острому перио-

Сокращения: АКЭ — асцитная карцинома Эрлиха, ПХЭ — полихроматофильные эритроциты, МЯ — микроядра.

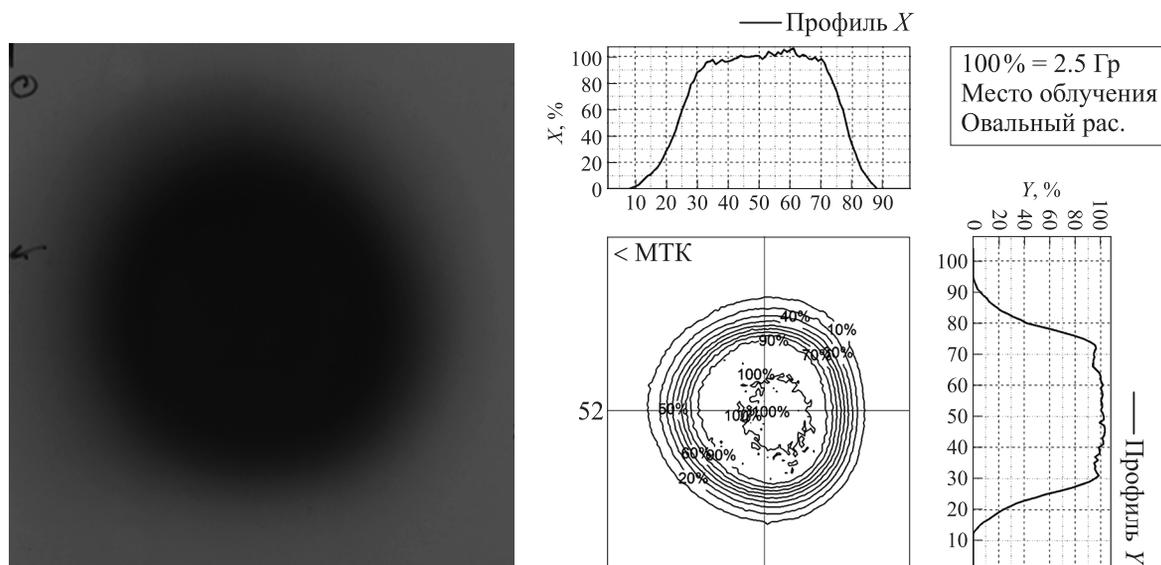


Рис. 1. Определение геометрических размеров и однородности дозы поля, сформированного протонным пучком, при помощи радиохромной пленки ЕВТЗ.

ду гипоксии в облученной ткани и, как следствие, к кратковременной радиационной резистентности. Оксигенация тканей *in vivo* осуществляется посредством кровотока, который также транспортирует иммунные клетки и является важным медиатором иммунного ответа *in vivo*. Из-за гораздо более короткого времени воздействия при флэш-облучении повреждается значительно меньшее количество крови по сравнению с обычными мощностями дозы. В последствии меньшее количество циркулирующих иммунных клеток подвергается воздействию радиации. Это хорошо согласуется с данными о том, что флэш-облучение индуцирует меньше провоспалительных цитокинов и улучшает инфильтрацию Т-клеток в облученных опухолях [5, 6], можно сделать вывод, что иммунная система является частью флэш-эффекта. Как следствие, объем облученной крови может играть важную роль в механизмах флэш-эффекта *in vivo*. Целью настоящей работы было исследование действия высокоэнергетического протонного облучения во флэш-режиме (80 Гр/с) в дозах 1 и 1.5 Гр на индукцию цитогенетических повреждений в костном мозге и состояние лимфоидных органов, в дозах 7 и 8 Гр на выживаемость при тотальном облучении мышей *in vivo* и в дозах 40 и 60 Гр на скорость роста солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) после облучения клеток *ex vivo*. Контролем служило облучение пучками протонов в тех же дозах, но при мощности 3 Гр/мин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Облучение животных проводили в лаборатории ядерных проблем ОИЯИ (Дубна, Москов-

ская область) на специальном стенде для радиационных исследований ускорителя фазотрон. Воздействие на мышей пучками протонов с энергией 660 МэВ осуществляли в двух режимах — флэш и стандарт. Мощность дозы при облучении в режиме флэш составляла 80 Гр/с, а для контрольной группы мощность была снижена до стандартной терапевтической — 3 Гр/мин. Линейная передача энергии протонов с энергией 660 МэВ составляла около 0.4 кэВ/мкм. Контроль отпущенной дозы осуществляли сотрудники лаборатории ядерных проблем ОИЯИ при помощи специализированных ионизационных камер и дозиметрической пленки (ЕВТЗ, США). Сформированное дозовое поле представляло собой окружность с полем диаметром 4 см на уровне 95%-й изодозы. На рис. 1 представлен профиль пучка протонов на радиохромной пленке и обработка данного пятна специальными программными средствами. Детальное описание методики формирования пучка и дозового контроля представлено в работе [7].

Все манипуляции с животными соответствовали нормативно-правовым актам о порядке экспериментальной работы с использованием животных [8]. Эксперименты проводили на ненаркотизированных двухмесячных самцах белых нелинейных мышей закрытой популяции SHK (массой 24–28 г), которые содержались в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН. Облучение проводили по одному животному в специальных перфорированных контейнерах тотально на все тело. На рис. 2 представлена фотография расположения животного на стенде для проведения экспериментов. Для исследования цитогенетиче-

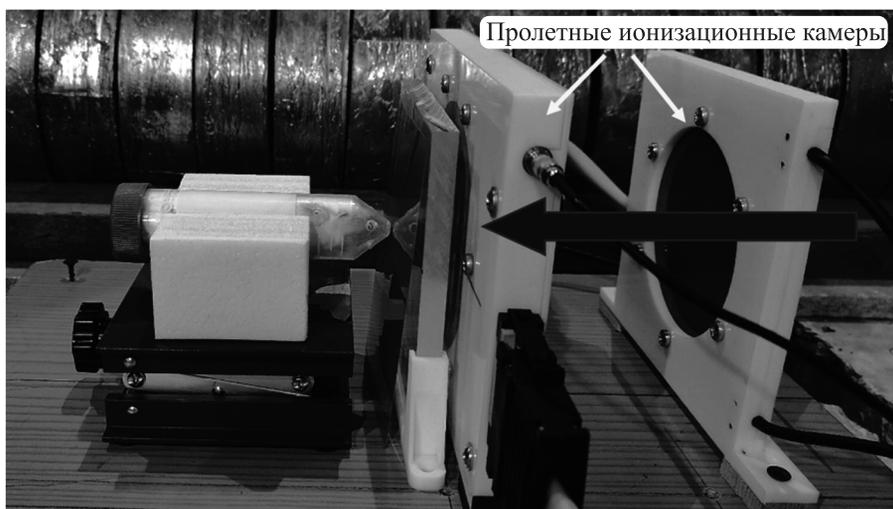


Рис. 2. Расположение животного в контейнере при облучении на стенде для радиационных исследований. Стрелкой обозначено направление пучка протонов.

ских повреждений облучение пучком протонов проводили в дозах 1.0 и 1.5 Гр. В каждой группе было не менее 5 животных. Через 28 ч после облучения животных выводили из эксперимента методом декапитации и производили забор органов и тканей. Критерием уровня цитогенетических повреждений служил процент полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ) в костном мозге бедренной кости мышей. Микроядерный тест широко используется в качестве анализа *in vivo* как одна из наиболее чувствительных и надежных методик для оценки индукции хромосомных aberrаций [9, 10]. У этих

же животных определяли индекс массы тимуса и селезенки, как отношение абсолютного веса органа к среднему весу животного в группе. Для исследования влияния мощности протонного облучения на выживаемость, были использованы дозы 7 и 8 Гр. В течение 40 суток после воздействия ежедневно вели контроль числа павших животных, по которым строили кривые выживаемости. По данным кривых оценивали динамику гибели мышей от облучения. Дополнительной тест-системой служила оценка воздействия протонов на опухолевые клетки. За 2 ч до облучения клетки АКЭ выделяли из мышей-опухоленосителей. Опухолевые клетки ресуспендировали в изотоническом растворе NaCl до концентрации $20 \cdot 10^6$ /мл и помещали в пробирки типа «Эппендорф» объемом 1.5 мл. Облучение проводили при аналогичных условиях облучения животных в двух режимах в дозах 40 и 60 Гр. Данная методика была ранее использована при облучении АКЭ протонами в пике Брэгга в диапазоне доз от 30 до 150 Гр [11]. На рис. 3 представлена фотография размещения пробирок с клетками АКЭ в специальном креплении на стенде для проведения экспериментов. Сразу после облучения суспензию АКЭ в количестве 2 млн клеток в 0.1 мл NaCl внутримышечно вводили в заднюю лапу здоровых необлученных животных для последующего анализа частоты появления опухолевого узла и динамики роста опухоли. Объем опухолевого образования оценивали при помощи электронного штангенциркуля в трех взаимно-перпендикулярных направлениях в течение 43 суток после инокуляции.

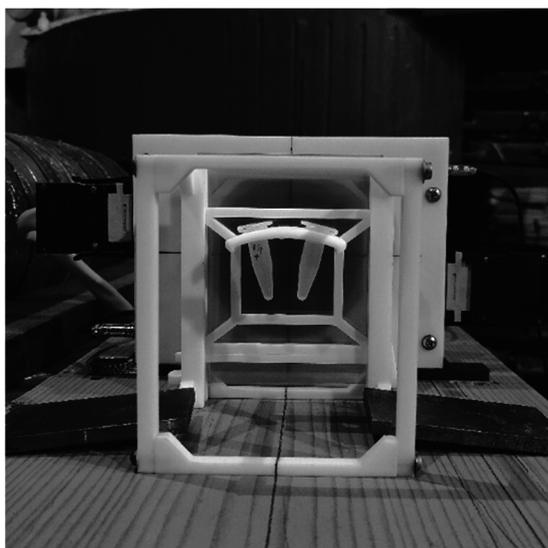


Рис. 3. Расположение пробирок с суспензией асцитной карциномы Эрлиха при облучении на стенде для радиационных исследований.

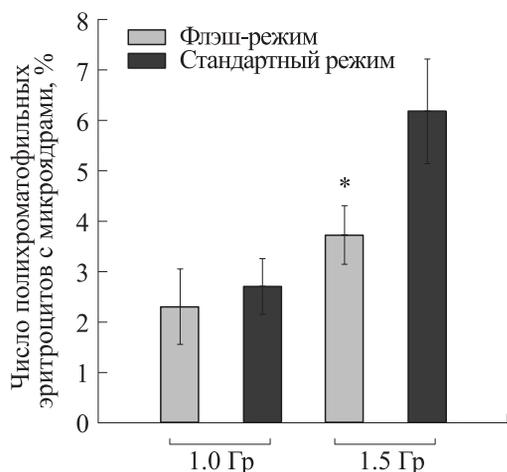


Рис. 4. Количество полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ) в клетках костного мозга мышей, облученных протонами с различной мощностью воздействия в дозах 1.0 и 1.5 Гр (* – $p < 0.05$ – статистически значимые отличия относительно стандартного режима).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 4 представлены данные по измерению количества ПХЭ с МЯ в костном мозге мышей, облученных протонами в дозах 1.0 и 1.5 Гр при разной величине мощности дозы. В группе мышей, облученных в дозе 1.0 Гр, как при стандартном, так и во флэш-режиме, количество цитогенетических повреждений было одинаковым ($2.70 \pm 0.56\%$ и $2.32 \pm 0.74\%$ соответственно). При облучении в дозе 1.5 Гр в режиме высокой мощности количество ПХЭ с МЯ возрастало незначительно ($3.73 \pm 0.60\%$), в отличие от группы животных, облученных в стандартном режиме, где уро-

вень повреждений возрос более чем в 2 раза (до $6.20 \pm 1.04\%$) по сравнению с группой 1.0 Гр. При сопоставлении полученных значений с группой 1.5 Гр, облученных во флэш-режиме, наблюдаются статистически значимые различия ($p < 0.05$). Уровни цитогенетических повреждений при облучении протонами в стандартном режиме в дозах 1.0 и 1.5 Гр соответствуют аналогичным, полученным нами ранее, при облучении протонным пучком, но в модифицированном пике Брэгга [12]. В случае с высокоинтенсивным воздействием в дозе 1.5 Гр при мощности 80 Гр/с наблюдается щадящий эффект, который наблюдается в ряде работ, использующих различные источники ионизирующего излучения [13, 14].

Одновременно с оценкой цитогенетических повреждений в костном мозге мышей определяли относительную массу лимфоидных органов. Тимус и селезенка наряду с костным мозгом являются кроветворными органами с активно пролиферирующей тканью, т.е. обладают высокой радиочувствительностью. Они одними из первых реагируют на различные экзогенные факторы. При анализе клеточности органов методом оценки индекса массы селезенки и тимуса (рис. 5) наблюдалось значительное снижение пролиферативной активности клеток селезенки во всех облученных группах по сравнению с необлученными животными. По индексу массы селезенки не замечены различия в группах, облученных в дозе 1.0 Гр независимо от мощности подведенной дозы. Статистически достоверные различия наблюдались при облучении в дозе 1.5 Гр во флэш-режиме по сравнению со стандартным режимом. При анализе клеточности тимуса по сравнению с необлученными животными наблюдалось умеренное снижение пролиферативной активности

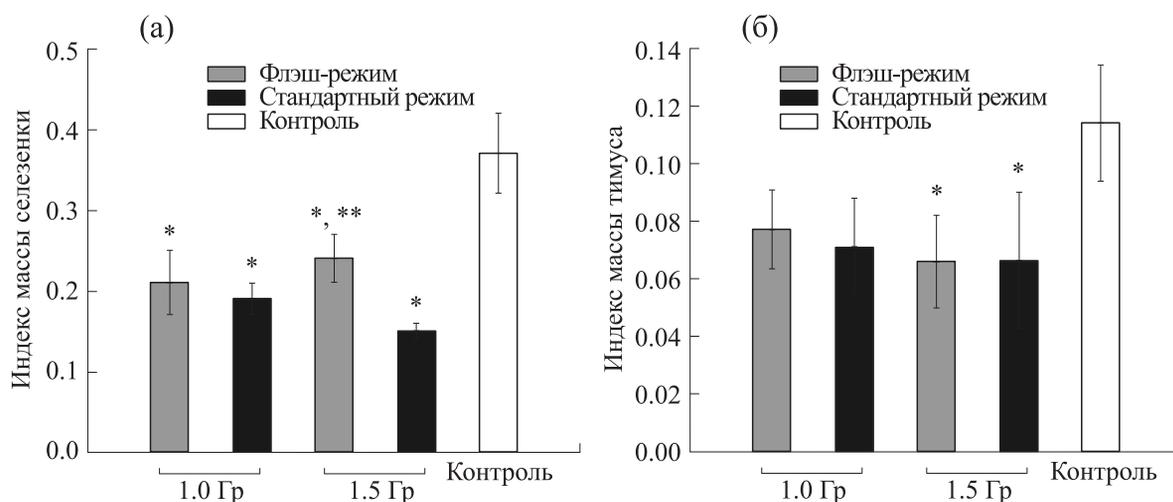


Рис. 5. Индекс массы селезенки (а) и тимуса (б) мышей, облученных протонами с различной мощностью воздействия в дозах 1.0 и 1.5 Гр. * – $p < 0.05$ – статистически значимые отличия относительно необлученного контроля; ** – $p < 0.05$ – статистически значимые отличия относительно стандартной мощности.

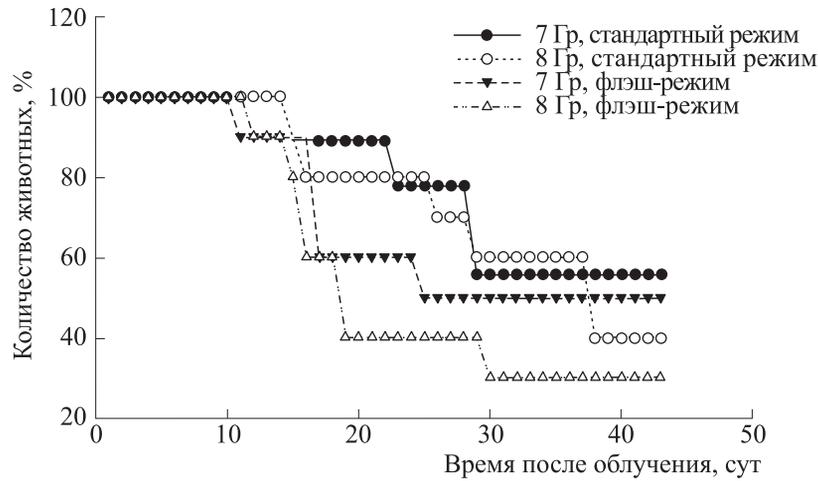


Рис. 6. Выживаемость мышей, облученных протонами с различной мощностью воздействия в дозах 7 и 8 Гр.

во всех облученных группах в сравнении с необлученными животными, значимые различия от контроля наблюдались только в дозе 1.5 Гр при обоих режимах доставки дозы. Большой разброс данных не позволил определить различия между облученными животными по данному критерию.

Несмотря на более щадящее воздействие флэш-облучения по критерию клеточности селезенки и образованию микроцелл в костном мозге животных, при проведении тотального облучения животных в большей, сублетальной дозе 7 и 8 Гр было обнаружено снижение выживаемости животных по сравнению со стандартным протонным облучением. На рис. 6 представлен график гибели животных в течении 43 суток после облучения в двух режимах. Однократное воздействие ионизирующего излучения на все тело млекопитающих приводит к развитию сложного набора симптомов, возникновение, характер и тяжесть которых зависят как от общей дозы радиации, так и от качества излучения. Известно, что гемопоэтический синдром возникает при дозах <10 Гр; это проявляется истощением гемопоэтических стволовых клеток и, в конечном итоге, истощением зрелых гемопоэтических и иммунных клеток. Несмотря на растущий интерес к облучению биологических объектов во флэш-режиме, литературных данных, описывающих воздействие данной методики на выживаемость целого организма, крайне мало. В работе [15] было исследовано воздействие летальной дозы протонного облучения с мощностью 100 Гр/с на выживаемость эмбрионов рыбок данио. Авторами не было выявлено значимого влияния мощности дозы протонов на выживаемость и другие показатели эмбрионов. Но при частичном флэш-облучении брюшной полости мышей протонами в дозе 16 Гр в работе [16] показана более высокая общая выжи-

ваемость через 21 сутки после воздействия по сравнению со стандартной мощностью. При увеличении дозы до 19 и 22 Гр, независимо от мощности дозы, все животные погибли через 12 суток после облучения. Вопрос определения механизма гибели животных при воздействии высокоинтенсивного протонного излучения остается актуальным и требует дальнейших исследований.

При исследовании более высоких доз протонного воздействия были облучены эппендорфы с суспензией АКЭ в дозе 40 и 60 Гр в двух режимах. После инокуляции облученных клеток *ex vivo* здоровым мышам появление опухолевого узла было отмечено только в группе облученных во флэш-режиме клеток в дозе 40 Гр. В данной группе имела место задержка появления опухолевых узлов, которая составила 7 суток. Однако после этого опухоли были отмечены у 80% животных, а последующая динамика роста образования не отличалась от контрольной, необлученной группы (рис. 7). Это может свидетельствовать о не полной гибели клеток АКЭ после облучения во флэш-режиме в дозе 40 Гр. В остальных облученных группах опухолевый узел не был обнаружен на протяжении всего времени наблюдения. Таким образом, эффект повышенной чувствительности опухолевых клеток к воздействию протонов сверхвысокой мощности не наблюдался. Причиной этому может служить нахождение клеток в виде суспензии в питательной среде в момент облучения, а не в условиях плотного узла внутри организма. При такой постановке эксперимента может иметь место эффект локальной нехватки кислорода, что согласуется с основной причиной возникновения защитного флэш-эффекта — кратковременное гипоксическое состояние. При такой методике исключено воздействие на кровоток и иммунную систему организма, ко-

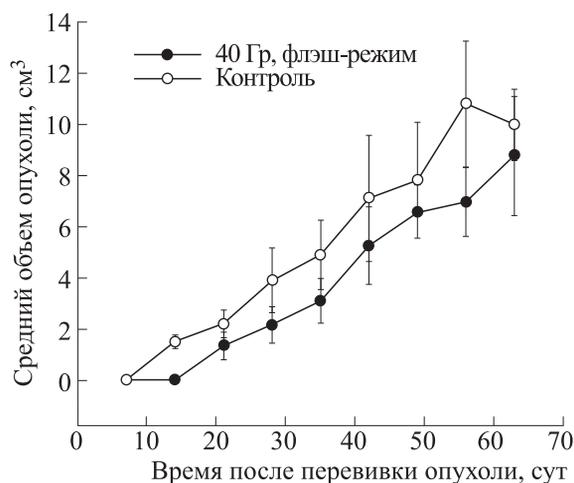


Рис. 7. Динамика роста солидной формы АКЭ у мышей после инокуляции не облученных и облученных протонами клеток *ex vivo* в дозе 40 Гр во флэш-режиме.

которые тоже являются частью эффекта флэш. Полученные данные будут в будущем учтены при флэш-облучении опухолевого узла непосредственно в лапе животного для определения эффективности данного вида лучевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показаны результаты облучения биологических объектов во флэш-режиме пучком протонов высокой энергии. По результатам сравнительного исследования трех независимых тест-систем было показано биологическое воздействие данного излучения на клетки кроветворной системы, определена выживаемость при тотальном облучении в летальной дозе и исследована динамика роста опухолевого узла при облучении опухолевых клеток в терапевтических дозах *ex vivo* с последующей инокуляцией животным.

При тотальном облучении мышей на фазотроне протонами с энергией 660 МэВ во флэш-режиме 80 Гр/с в диапазоне средних и высоких доз были выявлены существенные различия в динамике индукции цитогенетического ответа клетками костного мозга и патофизиологическом действии на лимфоидные органы по сравнению с действием стандартного режима облучения. Флэш-режим приводит к меньшему угнетению пролиферативной активности селезенки, а также вызывает меньше повреждений в эритроцитах костного мозга по микроядерному тесту при облучении животных в дозе 1.5 Гр. Стоит отметить, что при лучевой терапии опухолей в клинике стандартная терапевтическая доза за одну фракцию составляет 2.0 Гр, а дозу на уровне 1.0–1.5 Гр получают здоровые ткани вблизи опухолевого очага. Снижение вероятности повреждения здоровых тканей

при разрушении опухолевого узла является залогом успешного лечения и отсутствия вторичных лучевых эффектов у пациента.

Флэш облучение суспензии опухолевых клеток в дозе 40 Гр оказалось недостаточным для полной гибели опухолевых клеток, в отличие от облучения в стандартном режиме 3 Гр/мин. Как было сказано, данная модель не может однозначно рассматриваться как модель опухоли, так как клетки были облучены в виде суспензии вне организма. С точки зрения эффективности лечения опухоли, необходимо проведение работ по облучению опухолевого узла непосредственно в организме животного, что не входило в данную программу исследований ввиду сложности проведения таких процедур. Полученные данные позволяют оценить дозовую нагрузку на разные органы и ткани системы кроветворения при облучении животных средними и большими дозами протонов. Несмотря на то, что в лучевой терапии используются пучки протонов меньшей энергии для облучения мишеней в области пика Брэгга, результаты данного исследования явным образом показывают решающее влияние мощности подведенной дозы на биологический эффект по всем проведенным тестам. Для полноты исследования и для оценки применимости данной методики в клинической практике требуется продолжить работы по изучению воздействия режима высокой мощности и в области пика Брэгга.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИГЭБ РАН № 075-00224-24-03.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции проводили согласно нормативно-правовым актам о порядке экспериментальной работы с использованием животных [8], план экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 23 от 05.03.2022 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Diffenderfer E., Verginadis I., Kim M., Shoniyozov K., Velalopoulou A., Goia D., Putt M., Hagan S., Avery S., Teo K., Zou W., Lin A., Swisher-McClure S., Koch C., Kennedy A. R., Minn A., Maity A., Busch T. M., Dong L., Koumenis C., Metz J., and Cengel K. A. Design, implementation, and *in vivo* validation of a novel proton flash radiation therapy system. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **106** (2), 440–448 (2020). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2019.10.049
2. Favaudon V., Caplier L., Monceau V., Pouzoulet F., Sayarath M., Fouillade C., Poupon M. F., Brito I., Hupé P., Bourhis J., Hall J., Fontaine J. J., and Vozenin M. C. Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Sci. Transl. Med.*, **6** (245), 245ra93 (2014). DOI: 10.1126/scitranslmed.3008973
3. Soto L., Casey K., Wang J., Blaney A., Manjappa R., Breittkreutz D., Skinner L., Dutt S., Ko R., Bush K., Yu A., Melemenidis S., Strober S., Englemann E., Maxim P., Graves E., and Loo B. FLASH irradiation results in reduced severe skin toxicity compared to conventional-dose-rate irradiation. *Radiat. Res.*, **194** (6), 618–624 (2020). DOI: 10.1667/RADE-20-00090
4. Spitz D., Buettner G., Petronek M., St-Aubin J., Flynn R., Waldron T., and Limoli C. An integrated physico-chemical approach for explaining the differential impact of FLASH versus conventional dose rate irradiation on cancer and normal tissue responses. *Radiother. Oncol.*, **139**, 23–27 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.03.028
5. Simmons D., Lartey F., Schüler E., Rafat M., King G., Kim A., Ko R., Semaan S., Gonzalez S., Jenkins M., Pradhan P., Shih Z., Wang J., von Eyben R., Graves E., Maxim P., Longo F., and Loo B. Jr. Reduced cognitive deficits after FLASH irradiation of whole mouse brain are associated with less hippocampal dendritic spine loss and neuroinflammation. *Radiother. Oncol.*, **139**, 4–10 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.006
6. Rama N., Saha T., Shukla S., Goda C., Milewski D., Mascia A., Vatner R., Sengupta D., Katsis A., Abel E., Girdhani S., Miyazaki M., Rodriguez A., Ku A., Dua R., Parry R., and Kalin T. Improved tumor control through t-cell infiltration modulated by ultra-high dose rate proton flash using a clinical pencil beam scanning proton system. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **105**, S164–S165 (2019). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2019.06.187
7. Агапов А. В., Грицкова Е. А., Густов С. А., Мицын Г. В., Молоканов А. Г., Хасенова И., Швидкий С. В. и Шипулин К. Н. Формирование высокоинтенсивного пучка протонов для исследования флэш-эффекта в лучевой терапии. *Медицинская физика*, **4**, 29–39 (2023). DOI: 10.52775/1810-200X-2023-100-4-29-39
8. Директива 2010/63/еу Европейского парламента и Совета Европейского союза. URL.: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf (дата обращения: 12.03.2024 г.).
9. Krupina K., Goginashvili A., and Cleveland D. Causes and consequences of micronuclei. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **70**, 91–99 (2021). DOI: 10.1016/j.ceb.2021.01.004.
10. Hayashi M. The micronucleus test – most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes and Environ.*, **38**, 18 (2016). DOI: 10.1186/s41021-016-0044-x
11. Балакин В., Розанова О., Смирнова Е., Белякова Т., Стрельникова Н., Смирнов А. и Шемяков А. Индукция роста солидной формы асцитной карциномы эрлиха у мышей после облучения протонами опухолевых клеток *ex vivo*. *Докл. РАН. Науки о жизни*. **511** (1), 360–364 (2023). DOI: 10.31857/S2686738923600152
12. Балакин В., Розанова О., Смирнова Е., Белякова Т., Шемяков А., Заичкина С., Сорокина С. и Дюкина А. Действие низких и средних доз тонкого сканирующего пучка протонов на органы кроветворения при тотальном облучении мышей. *Докл. РАН. Науки о жизни*. **494** (1), 458–462 (2020). DOI: 10.31857/S2686738920050042.
13. Lin B., Gao F., Yang Y., Wu D., Zhang Y., Feng G., Dai T., and Du X. FLASH radiotherapy: history and future. *Front. Oncol.*, **11**, 644400 (2021)ю DOI: 10.3389/fonc.2021.644400.
14. Hughes J. and Parsons J. FLASH radiotherapy: current knowledge and future insights using proton-beam therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6492 (2020). DOI: 10.3390/ijms21186492.
15. Beyreuther E., Brand M., Hans S., Hideghety K., Karsch L., Lebmann E., Schurer M., Szabo E., and Pawelke J. Feasibility of proton FLASH effect tested by zebrafish embryo irradiation. *Radiother. Oncol.*, **139**, 46–50 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.024.
16. Zhang Q., Cascio E., Li C., Yang Q., Gerweck L., Huang P., Gottschalk B., Flanz J., and Schuemann J. FLASH investigations using protons: design of delivery system, preclinical setup and confirmation of FLASH effect with protons in animal systems. *Radiat. Res.*, **194** (6), 656–664 (2020). DOI: 10.1667/RADE-20-00068.1.

Results of FLASH Irradiation of Mice *in vivo* with High-Energy Protons

A.E. Shemyakov^{* **}, A.R. Dyukina^{*}, S.I. Zaichkina^{*}, A.V. Agapov^{***},
G.V. Mitsyn^{***}, and K.N. Shipulin^{***}

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

^{**}*Physical-Technical Center of the Physical Institute, Russian Academy of Sciences,
ul. Mira 1N, Protvino, Moscow Region, 142280*

^{***}*Joint Institute for Nuclear Research, ul. Joliot-Curie 6, Dubna, Moscow Region, 141980*

The FLASH effect of high-energy (660 MeV) proton irradiation using the Phasotron accelerator with the capacity of delivering dose rates of 80 Gy/s has been studied and compared to the effect after exposure to proton radiation at a conventional dose rate of 3 Gy/min. After FLASH and conventional dose-rate irradiation with doses of 1.0 and 1.5 Gy, the induction of cytogenetic damage to bone marrow cells and the state of lymphoid organs (thymus and spleen) were estimated; at doses of 7.0 and 8.0 Gy, the survival rate after total irradiation of mice *in vivo* was analyzed; and at doses of 40 and 60 Gy, the tumor growth rate was determined after irradiation *ex vivo*. It has been shown that irradiation of animals using the FLASH mode at a dose of 1.5 Gy protects the proliferative activity of the spleen and also leads to a decrease in cytogenetic injuries in bone marrow erythrocytes, based on the micronucleus test, as compared to the conventional irradiation at a dose of 1.5 Gy; thus, the FLASH effect has lower toxicity compared to conventional radiation. However, irradiation of mice, the FLASH effect which delivers high doses (7.0 and 8.0 Gy) of radiation, leads to earlier death of animals compared to those exposed to conventional radiation. Only after FLASH irradiation of a suspension of Ehrlich ascites carcinoma at a dose of 40 Gy, a tumor node with further growth was formed; no tumors were formed in all other groups.

Keywords: proton irradiation, FLASH effect, micronuclei, Ehrlich ascites carcinoma, survival rate, mice