

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ПРОТОНОВ С ЭНЕРГИЕЙ 90–170 МэВ НА ОРГАНЫ КРОВЕТВОРЕНИЯ ПРИ ТОТАЛЬНОМ ОБЛУЧЕНИИ МЫШЕЙ ТОНКИМ СКАНИРУЮЩИМ ПУЧКОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛИНЕЙНОЙ ПОТЕРИ ЭНЕРГИИ ЧАСТИЦ

© 2024 г. О.М. Розанова^{*,#}, Т.А. Белякова^{*}, Е.Н. Смирнова^{*}, С.С. Сорокина^{*},
А.Р. Дюкина^{*}, А.Е. Шемяков^{*,**}, Н.С. Стрельникова^{**}

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

^{**}Филиал «Физико-технический центр» Физического института им. П.Н. Лебедева РАН,
ул. Мира, 1Н, Протвино Московской области, 142281, Россия

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

Поступила в редакцию 14.03.2024 г.

После доработки 05.06.2024 г.

Принята к публикации 19.06.2024 г.

Исследовано действие протонного излучения при тотальном облучении мышей до пика и в пике Брэгга в диапазоне доз 0.1–1.5 Гр на индукцию цитогенетических повреждений в костном мозге, продукцию активных форм кислорода в цельной крови, состояние тимуса и селезенки в зависимости от линейной потери энергии. Обнаружено, что выход полихроматофильных эритроцитов с микроядрами при всех дозах протонного излучения в пике Брэгга с линейной потерей энергии 2.5 кэВ/мкм был близок к уровню линейной потери энергии с микроядрами для соответствующих доз рентгеновского излучения с линейной потерей энергии 2.0 кэВ/мкм, а при облучении до пика Брэгга с линейной потерей энергии 0.7 кэВ/мкм уровень цитогенетических повреждений был значительно ниже. Коэффициент относительной биологической эффективности, рассчитанный по выходу линейной потери энергии с микроядрами для протонов в пике Брэгга, равнялся 1.15, а до пика — 0.63. Выявлены органоспецифические различия в закономерностях патофизиологического действия в зависимости от величины дозы и линейной потери энергии протонов на тимус, селезенку мышей и состояние антиоксидантной системы клеток крови.

Ключевые слова: протоны, линейная потеря энергии, микроядра, тимус, селезенка, АФК, мыши.

DOI: 10.31857/S0006302924040207, EDN: NFCVUR

Актуальность исследования особенностей действия протонного излучения (ПИ) в настоящее время по-прежнему остается высокой. Применение протонов для радиотерапии обусловлено специфическим распределением поглощенной дозы, описываемым кривой Брэгга, при прохождении через биологическую ткань: относительно низкая энергия частиц на входе, затем на заранее определенной глубине наличие пика Брэгга — максимального энерговыделения в конце пробега частицы, то есть непосредственно в опухоли, а затем, после пика, резкое падение энергии до нуля, что позволяет не повреждать

здоровые ткани за опухолью [1]. В мире и нашей стране активно развиваются центры протонной терапии (ПТ), в которых при лечении как наиболее распространенных онкологических заболеваний (рак молочной железы и простаты) [2, 3], так и редких, радиорезистентных, с высокой степенью рецидивирования (рак мозга) [4], используют современную технологию сканирования тонким пучком протонов по заданному объему мишени. Метод основывается на сложных системах планирования облучения и множественных магнитах, которые перемещают остроуправляемый пучок протонов вдоль вертикальной и горизонтальной осей, и в процессе движения его интенсивность модулируется. Такой способ доставки дозы позволяет облучать большие поля с субмиллиметровой точностью, улучшает 3D-конформацию дозы и существенно снижает дозы нейтро-

Сокращения: ПИ — протонное излучение, ПТ — протонная терапия, ОБЭ — относительная биологическая эффективность, АФК — активные формы кислорода, ЛПЭ — линейная потеря энергии, РИ — рентгеновское излучение, ПХЭ — полихроматофильные эритроциты.

нов, что позволяет уменьшить интегральную лучевую нагрузку на тело пациента по сравнению с другими методами ПТ и современными методами фотонной лучевой терапии, значительно уменьшая риск постлучевых осложнений и развития рецидивов [5]. Следует подчеркнуть, что за счет возможности высокоточного облучения протонами даже маленького объема мишени и отсутствия частиц после пика Брэгга, в отличие от ионов углерода и нейтронов, даже небольшое увеличение значения относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов дает существенное преимущество для терапии. Кроме того, в связи с появлением в нашей стране нескольких новых центров ПТ, созданием протонных томографов возникла проблема оценки лучевых нагрузок на персонал этих центров, а также сотрудников предприятий, работающих со смешанными полями излучений, что будет способствовать безопасному внедрению новых технологий и развитию промышленной медицины.

Помимо медицинского применения другой причиной для исследования действия высокоэнергетических ускоренных частиц является решение задач космической радиобиологии, связанных с увеличением длительности и дальности космических полетов, которые требуют корректировки оценки биологического действия ускоренных частиц высоких энергий и поиск мер радиационной защиты экипажей, а также радиобиологического обоснования для преодоления радиационного барьера, обусловленного галактическим космическим излучением, которое на 95% состоит из протонов с энергией около 100 МэВ [6–8].

Наиболее значимый для практики объем данных о действии протонов и уточнения значений ОБЭ накапливается в центрах ПТ по критериям эффективности лечения разных видов опухолей. Использование этих данных для понимания закономерностей действия протонов на здоровые и опухолевые ткани пока ограничивается большим индивидуальным разбросом между пациентами, небольшими выборками однотипных случаев, а также различием в технических конструкциях и физических характеристиках терапевтических установок [9]. Несмотря на то, что во всем мире с помощью ПТ пролечено уже около 350 000 человек (<https://www.ptcog.site/index.php/patient-statistics>), а Международной комиссией по радиационным единицам и измерениям для применения в клиниках для ПТ рекомендована величина ОБЭ, равная 1.1, исследования по уточнению значения ОБЭ протонов продолжают, поскольку фиксированное значение ОБЭ ставится под сомнение с позиции оценки безопасности пациентов, так как если доза в опухоли слишком низкая, то риск рецидива увеличивается, а если завыше-

на, то возрастает вероятность возникновения негативных эффектов [10].

В настоящее время недостаточно известно о биологических эффектах действия протонов с энергией около 100 МэВ до пика и в пике Брэгга на клетки костного мозга, органы иммунной системы и продукцию активных форм кислорода (АФК) при тотальном облучении животных низкими (до 0.5 Гр) и средними дозами (до 2 Гр). В ряде исследований было продемонстрировано, что величина ОБЭ протонов, которая высчитывается относительно действия фотонных (гамма- или рентгеновского) излучений, находится в диапазоне 1.1–1.8 в зависимости от линейной потери энергии частиц (ЛПЭ), дозы, чувствительности объекта, условий облучения, сроков регистрации эффектов и критериев оценки [11, 12]. Эти значения ОБЭ протонов основаны, в основном, на результатах экспериментов по выживаемости культивируемых нормальных и опухолевых клеток при облучении *in vitro* с помощью методик, которые требуют применения высоких доз однократного облучения порядка 2–30 Гр, или с помощью более чувствительной оценки хромосомных повреждений в культивируемых клетках *in vitro*, условия облучения которых не соответствуют концентрациям кислорода в тканях, распределению по клеточному циклу, влиянию микроокружения и другим сложным процессам взаимодействия систем и органов целого организма [13]. Для того чтобы понять, как первичные молекулярные и клеточные повреждения реализуются через индукцию специфических и общих каскадных событий в тканевые и организменные ответы, необходимы исследования при облучении ПИ животных.

В ряде работ показано, что хотя регистрируемые биологические эффекты гамма- и рентгеновского излучения (РИ), относительно которых сравнивают действие протонов и вычисляют величину ОБЭ, очень близки, однако реализация их происходит за счет специфических процессов: начиная со способа взаимодействия частиц с живым веществом и передачи энергии до качества и локализации на хромосоме первичных повреждений ДНК, активации определенных регуляторных каскадов, приводящих к формированию конечного показателя [14]. Поскольку сейчас уже достаточно подробно исследованы первичные ключевые молекулярные мишени и механизмы, на которые влияют высокоэнергетические частицы [15], то для биологической характеристики пучков в условиях облучения животных при низких и терапевтических дозах целесообразно использовать методы, которые бы отражали состояние наиболее чувствительных органов и тканей, таких как костный мозг, тимус, селезенка, кровь в те временные сроки, когда регистрируются повреждения генома как стволовых клеток, так и

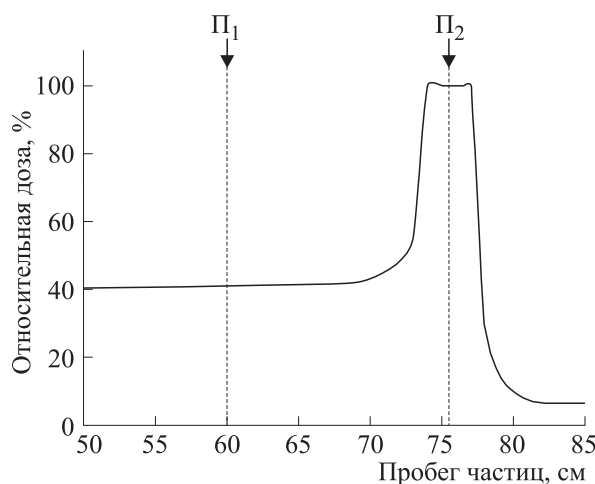


Рис. 1. Расположение мышей во время облучения на различных участках кривой Брэгга: (П1) — позиция облучения до пика Брэгга, (П2) — позиция облучения в пике Брэгга.

пролиферирующих, имеющие критическое значение для таких процессов, как мутагенез, канцерогенез и преждевременное старение [16].

Таким образом, целью работы было исследование действия протонного излучения, сформированного по технологии тонкого сканирующего пучка, до пика и в пике Брэгга относительно рентгеновского излучения в диапазоне доз 0.1–1.5 Гр на индукцию цитогенетических повреждений в костном мозге, продукцию АФК в цельной крови, вес тимуса и селезенки при тотальном облучении мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах аутбредных нелинейных мышей колонии SHK с массой тела 31–35 г, полученных из питомника животных «Столбовая» НЦ ФМБА, которых разводили и содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино, Московская обл.) при комнатной температуре, естественном световом дне и свободном доступе к пище и воде [17]. Мышей содержали в полипропиленовых клетках по 10 особей. Все процедуры проводили в соответствии с нормативно-правовыми актами, касающимися экспериментов на животных и гуманного обращения с животными [18].

Перед облучением мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией ксилазин/золетиловой смеси 0.7/3.4 мг/кг (Interchemie Werken, BV, Нидерланды, Virbac Sante Animale, Франция). В каждом эксперименте был контроль, учитывающий транспортировку, наркотизацию и имитацию облучения животных. В группах на каждую экспериментальную точку было не менее 5 мышей и проведено 2–3 независимых эксперимента.

Мышей облучали тотально до пика и в пике Брэгга в дозах 0.1, 0.5, 1.0 Гр и 1.5 Гр на протонном синхротроне в ЦКП «Прометеус» ФТЦ ФИАН (Протвино, Московская обл.) с применением технологии сканирования пучком с одного направления. Для формирования требуемых параметров облучения фокусировка пучка осуществлялась с помощью квадрупольных линз, а отклонение пучка по горизонтали и вертикали — двумя поворотными магнитами. В процессе облучения с применением технологии тонкого сканирующего пучка происходит отклонение протонов с разной энергией на заданный угол и постепенно «закрашивается» весь облучаемый объем пучками частиц с модулируемой интенсивностью. Угол отклонения, интенсивность и энергия протонов рассчитываются в специальной программе планирования методом Монте-Карло.

Для точного позиционирования во время облучения мышей на специальной платформе располагали в индивидуальном быстроразъемном, хорошо вентилируемом, пластиковом контейнере размером 80×40×50 мм с толщиной стенки 1 мм. Расположение мышей по направлению пучка протонов при облучении в разных областях кривой Брэгга представлено на рис. 1. Животных располагали правой стороной тела перпендикулярно к оси пучка на соответствующих расстояниях от выпускного окна ускорителя. При облучении в модифицированном пике Брэгга для смещения в диапазон энергий протонов более 70 МэВ перед контейнером с животным располагался водный фантом толщиной 60 мм, что позволяло получить более однородное дозовое распределение в теле животного с хорошим градиентом доз на границах мишени. С помощью трехмерной программы планирования по томограмме мыши определяли облучаемый объем (тело животного), который равнялся

65.4 см³. Расчет дозы осуществляли в программе планирования, разработанной для дозового планирования курсов облучения пациентов с опухолями, которая входит в комплекс ПТ «Прометейс». Равномерность дозового распределения с максимальным и минимальным отклонением дозы от заданного значения составляло не более 5%. Облучение проводили в импульсном режиме с длительностью импульса 200 мс (1 импульс в 2 с). При облучении в модифицированном пике Брэгга мощность дозы составляла 0.1–1.0 Гр/мин (число частиц $1.28 \cdot 10^9$ – $1.97 \cdot 10^{10}$) в зависимости от дозы, а энергия частиц на выходе из ускорителя составляла 90–116 МэВ. Оценочное среднее значение ЛПЭ составляло 2.5 ± 0.7 кэВ/мкм.

Для облучения мышей до пика Брэгга было сформировано однородное дозовое поле прямоугольной формы размером 40×70 мм. Энергия частиц в данном случае составляла 170 МэВ, что соответствует ЛПЭ на плато 0.70 ± 0.04 кэВ/мкм, при мощности дозы 0.1–0.9 Гр/мин (число частиц $3.25 \cdot 10^9$ – $5.00 \cdot 10^{10}$). Контроль дозы проводили клиническим дозиметром на основе алмазного детектора (ИФТП, Россия) и дозиметрической пленкой (ЕВТ2, США), которая позволяет измерить дозу протонного излучения в диапазоне 0.01–40 Гр.

Для определения коэффициента ОБЭ контрольные группы мышей были облучены РИ на установке РУТ (200 кВ, 2 кэВ/мкм, 1 Гр/мин; ЦКП «Источники излучения» ИБК РАН, Пушкино, Московская обл.). Облучение мышей РИ, которое является фотонным, осуществлялось равномерно по всему телу в тех же дозах и условиях (анестезия, транспортировка к источникам облучения), что и при ПИ.

Через 28 ч после облучения мышей выводили из эксперимента методом декапитации и одновременно проводили забор клеток крови, костного мозга, тимуса и селезенки по общепринятым методикам. Период в 28 ч был выбран на основе наших предыдущих результатов для регистрации максимального уровня хромосомных повреждений в эритроцитах костного мозга с учетом длительности стадий эритропоэза и радиационной задержки клеточного цикла [19]. Цитогенетические препараты клеток костного мозга готовились по стандартной методике [20] с некоторыми модификациями. Критерием уровня цитогенетических повреждений служил процент полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами в костном мозге. На каждую экспериментальную точку использовали не менее 5 мышей и анализировали не менее 3000 ПХЭ с каждого препарата. Тимус и селезенка наряду с костным мозгом являются важными кроветворными органами с активно пролиферирующей тканью и характеризуются высокой радиочувствительностью. Индекс

массы тимуса и селезенки определяли по отношению величины средней массы органа к величине средней живой массы животного соответствующих групп. Уровень продукции АФК в цельной крови мышей измеряли методом люминол-зависимой, зимозан-индуцированной хемилюминесценции с помощью 12-канального прибора СНЕМILUM-12. Определяли значения светоплощади под кривой при спонтанной ($S_{\text{сп}}$) и индуцированной хемилюминесценции ($S_{\text{инд}}$), а также индекс активации, который рассчитывали как отношение $S_{\text{инд}}/S_{\text{сп}}$, который характеризует усиление хемилюминесценции. Достоверность различий между выборками оценивали с помощью t -критерия Стьюдента в случае распределения, близкого к нормальному, и с помощью непараметрического U -критерия Манна–Уитни для распределения, отличающегося от нормального. Вероятность ошибки $p < 0.05$ считали достаточной для вывода о статистической значимости различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод регистрации хромосомных повреждений в эритроцитах костного мозга при облучении низкими дозами протонов является высокочувствительным и позволяет судить о чувствительности облученных стволовых клеток костного мозга, поскольку через 28 ч в результате эритропоэза их повреждения анализируются в дифференцированных клетках на этапе выхода в кровяное русло.

При определении уровня цитогенетического повреждения в ПХЭ костного мозга мышей было обнаружено (рис. 2), что уровни ПХЭ с микроядрами при всех дозах ПИ в пике Брэгга были близки к таковым при действии соответствующих доз РИ, а при облучении до пика Брэгга уровень цитогенетических повреждений был значительно ниже. Дозовые зависимости % ПХЭ с микроядрами в клетках костного мозга мышей при облучении как РИ, так и протонами, описывались линейной аппроксимацией, и с помощью регрессионного и корреляционного анализов получены следующие уравнения «доза–эффект»: для протонов до пика Брэгга – $y = 0.28 + 2.75x$; в пике Брэгга – $y = 0.88 + 3.82x$; для РИ – $y = 0.67 + 3.63x$, где y – % ПХЭ с микроядрами, x – доза облучения, Гр. Ранее нами на культурах клеток млекопитающих, растениях и мышах при исследовании низких доз гамма-излучения был показан нелинейный сложный характер дозовых зависимостей, которые характеризовались участками радиационно-индуцированной гиперчувствительности и радиорезистентности [21, 22]. При действии низких доз протонов при облучении культивируемых клеток

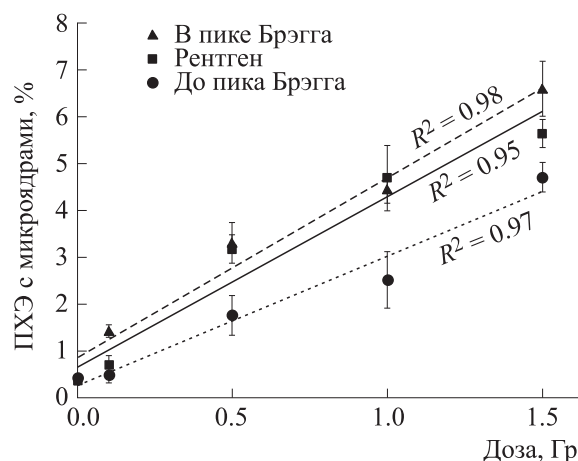


Рис. 2. Дозовые зависимости выхода полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге мышей при облучении до пика и в пике Брэгга пучком протонов и рентгеновским излучением.

рядом исследователей тоже показаны нелинейные закономерности [23], но при используемых условиях облучения мышей мы этого не наблюдали. Дискуссия по поводу различий в механизмах индукции и формирования повреждений хромосом в диапазоне малых доз протонов относительно эффектов фотонных излучений продолжается [24].

Коэффициент ОБЭ для протонов в пике Брэгга с ЛПЭ ~ 2.5 кэВ/мкм, вычисленный по равноэффективным дозам, равнялся 1.15. Данная величина близка к значениям, определенным в этом же диапазоне доз для протонных пучков других энергий и конфигураций, полученных по тесту выживаемости и клоногенной способности на культурах нормальных и опухолевых клеток, а также по уровню различных повреждений ДНК [25, 26]. В работе [27] при облучении в стационарной стадии клеток китайского хомячка V-79 и фибросаркомы B14-150 в диапазоне доз 2–10 Гр по тесту клоногенной активности ОБЭ сканирующего пучка протонов на установке «Прометеус» с одного или трех направлений составляла 1.0 и не зависела от способа доставки дозы в мишень. Полученное нами значение ОБЭ отражает раннюю радиочувствительность стволовых клеток костного мозга, одного из важнейших органов кроветворной и иммунной систем, обладающим огромным репопуляционным потенциалом [8]. В большинстве цитируемых работ ОБЭ протонов вычислялось относительно гамма-излучения с низкими значениями ЛПЭ = 0.35–0.70 кэВ/мкм, а в нашей работе используется жесткое РИ с ЛПЭ = 2 кэВ/мкм, у которого собственное значение ОБЭ по отношению к γ -излучению ^{60}Co равно 1.1–1.2 [28]. Учитывая это обстоятельство, ОБЭ исследуемого нами ПИ в пике Брэгга может составлять около 1.3, что свидетельствует о высоком каче-

стве режима доставки дозы в мишень, и за счет высокоточного локализованного облучения, по-видимому, позволит значительно повысить противоопухолевую эффективность пучка.

Величина ОБЭ протонов по критерию микроядер в ПХЭ при облучении до пика Брэгга с ЛПЭ ~ 0.7 кэВ/мкм, вычисленная также по равноэффективным дозам, равнялась 0.63, что соответствует большинству результатов, полученных при облучении *in vitro* клеточных культур при других дозах схожих по физическим характеристикам пучков протонов [29]. Облучение объектов *in vivo* до пика Брэгга в исследуемых нами дозах моделирует радиационные условия, которые возможны при активности галактического космического излучения [6], а также нагрузку на здоровые ткани, расположенные перед глубоко локализованными опухолями. В ряде случаев в зависимости от типа, размера, глубины и локализации опухолей в клиниках при ПТ с использованием как технологии сканирования пучком, так и при облучении пассивным пучком с помощью коллиматоров, используют облучение до пика Брэгга. Определенное нами ОБЭ может учитываться при корректировке расчета клинической дозы облучения. Ранее нами по критерию 30-суточной выживаемости при облучении мышей этим же пучком протонов в сублетальных и летальных дозах в диапазоне 4.5–15 Гр до и в пике Брэгга были определены более низкие значения ОБЭ, равные 0.83 и 0.94, характеризующие отсроченную реализацию ответов всех чувствительных к облучению органов, обладающих быстро делящимися клетками, прежде всего, костного мозга и желудочно-кишечного тракта [30]. Полученные в ходе настоящей работы результаты демонстрируют еще раз зависимость величины ОБЭ от уровня доз, времени и критериев регистрации поврежде-

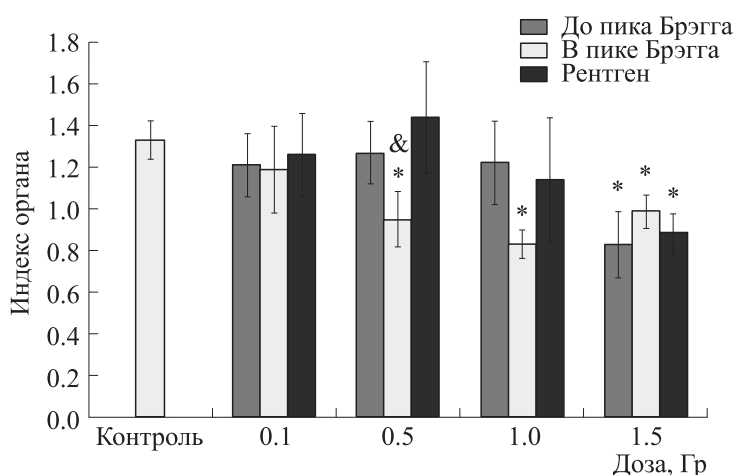


Рис. 3. Индексы массы тимуса мышей после облучения пучком протонов до- и в пике Брэгга в диапазоне доз 0.1–1.5 Гр: * – статистически значимые отличия относительно необлученного контроля ($p < 0.05$), & – статистически значимые отличия при облучении протонами в пике относительно облучения до пика Брэгга и рентгеновским излучением ($p < 0.05$).

ний. Ранее на других ускорителях с использованием пассивно-рассеянных пучков протонов разных энергий на животных были получены противоречивые данные о связи ЛПЭ с ОБЭ в отношении отдаленных последствий облучения [31]. В экспериментах на культурах и тканях млекопитающих при оценке краткосрочных эффектов протонов при аналогичных дозах было определено, что в низком диапазоне ЛПЭ 0.3–10 кэВ/мкм величина ОБЭ протонов ниже или близка к единице, и при двух-трехкратном увеличении ЛПЭ не наблюдается роста ОБЭ [32], в отличие от ионов углерода и нейтронов, которые применяются в радиотерапии, и ЛПЭ которых значительно выше. Таким образом, в настоящем исследовании ЛПЭ протонов до пика Брэгга по сравнению с облучением в пике в 3.5 раза ниже, а ОБЭ по критерию поврежденный хромосом меньше в 2 раза, что указывает на зависимость ОБЭ от ЛПЭ в этом режиме облучения и при регистрации через 28 ч после облучения. По критерию выживаемости мышей ОБЭ не зависело от ЛПЭ частиц, что указывает на то, что при действии низких и средних доз наблюдаются другие закономерности.

На рис. 3 представлены результаты определения индексов массы тимусов мышей, облученных до пика и в пике Брэгга в исследуемом диапазоне доз. Обнаружено, что при действии протонов в пике Брэгга уменьшение индекса массы тимуса начиналось при дозе 0.5 Гр в отличие от вариантов, облученных протонами до пика Брэгга или РИ, в которых снижение массы органа регистрировалось только при дозе 1.5 Гр. Это указывает на большее повреждающее действие протонов на тимус по сравнению с костным мозгом, при том, что значения ЛПЭ протонов в

пике Брэгга ненамного выше, чем у РИ. При сравнении эффектов РИ и протонов до пика Брэгга оказалось, что протоны со значительно низкой ЛПЭ (0.7 кэВ/мкм) вызывали такое же снижение индекса массы тимуса, что и РИ (ЛПЭ = 2 кэВ/мкм), что свидетельствует о специфическом действии протонов на гетерогенную клеточную популяцию тимуса. Снижение веса тимуса является чувствительным и показательным методом при определении ОБЭ излучений, в том числе и протонов, что было показано в работе [33].

Как видно из результатов, представленных на рис. 4, изменения в индексе массы селезенки наблюдаются уже при облучении протонами в дозе 0.1 Гр как до пика, так и в пике Брэгга, в то время как при действии РИ снижение индекса органа наблюдается, начиная с дозы 0.5 Гр, то есть также наблюдалась более высокая биологическая эффективность протонов при действии на эти органы, причем клетки селезенки были более радиочувствительными по сравнению с тимусом. Выявленные различия реакций органов могут являться результатом перераспределения клеток, обладающих разной радиочувствительностью и пролиферативно-дифференцировочным потенциалом между тканями. В работе [34] было показано, что при облучении мышей ионами железа с ЛПЭ = 148.2 кэВ/мкм в дозах 0.1, 0.5 и 2 Гр на 4-е сутки наблюдалось зависимое от дозы снижение массы тимуса и селезенки. При этом выраженная атрофия тимуса наблюдалась уже при дозе 0.5 Гр, а селезенки – только при дозе 2 Гр. Кроме этого, при дозе 2 Гр в селезенке снижалось число лимфоцитов и гранулоцитов, но не моноцит-макрофагов. В некоторых работах показана разная зависимость атрофии этих лимфоидных органов от дозы при

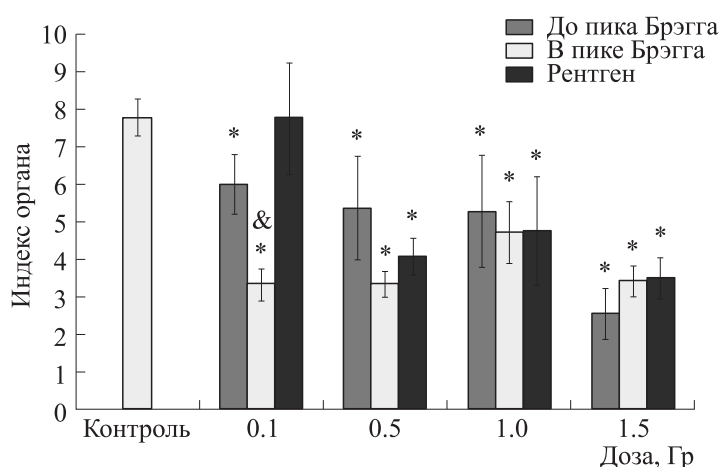


Рис. 4. Индексы массы селезенки мышей после облучения пучком протонов до и в пике Брэгга в диапазоне доз 0.1–1.5 Гр: * – статистически значимые отличия относительно необлученного контроля ($p < 0.05$), & – статистически значимые отличия при облучении протонами в пике относительно облучения до пика Брэгга и рентгеновским излучением ($p < 0.05$).

действию гамма-лучей и протонов [35]. Вероятно, существует несколько факторов, влияющих на радиационно-индуцированное снижение массы лимфоидных органов, включая клеточную гибель, изменения в транспортировке лимфоцитов и обезвоживание тканей. В работе [16] при гистологическом и иммунохимическом исследовании тимуса, селезенки и костного мозга при тотальном облучении мышей равноэквивалентными дозами гамма-излучения и протонов показано, что эти виды излучения запускают клеточную гибель в органоспецифической манере; протоны индуцируют больше повреждений ДНК, а экспрессия генов в селезенке имеет уникальные паттерны в отличие от других органов. Индукция апоптоза также сильно варьировала в зависимости от дозы и ткани, а клеточная гибель в костном мозге была значительно ниже у облученных протонами животных.

Известно, что действие радиации на клетки индуцирует острый оксидативный стресс, который характеризуется повышенным уровнем АФК, что является основной причиной повреждения критических структур и молекул в клетке. Эти уровни регистрируются сразу или в течение первых часов после облучения в средних нелетальных дозах. При исследовании спонтанной продукции АФК клетками крови мышей в отдаленные сроки (через 28 ч) после облучения протонами, когда регистрировались цитогенетические повреждения в костном мозге, при всех дозах не было обнаружено различий в уровнях индукции АФК в зависимости от ЛПЭ протонов, так же и мышей, облученных этими же дозами РИ. Уровни АФК при облучении были близки к таковым у необлученного контроля (рис. 5). Однако при расчете индекса активации, который характеризует усиление хе-

милюминесценции, у мышей, облученных протонами в пике Брэгга в дозе 0.1 Гр, этот показатель увеличивался в 2.5 раза, в дозе 0.5 Гр – в 4.3 раза, а при 1 Гр – в 3.2 раза относительно необлученного контроля и мышей после облучения РИ (рис. 6). При облучении протонами до пика Брэгга или РИ такое усиление хемилюминесценции не наблюдалось.

Выявленные особенности указывают на стимуляцию резервных возможностей нейтрофилов к генерации АФК при действии низких доз протонов в пике Брэгга, что свидетельствует о повышенном напряжении антиоксидантной системы. Реакция клеток крови на облучение протонами в этом диапазоне доз по сравнению с фотонами свидетельствует о резком различии в работе антиоксидантной системы, что еще раз свидетельствует о специфике действия частиц по сравнению с РИ в зависимости от дозы. В работе [36] после облучения в пике Брэгга протонами с энергией 250 МэВ в более высоких дозах в 1–10 Гр на культуре предшественников нервных клеток показано, что уровень АФК увеличивается в 3 раза быстрее на 1 Гр дозы к 6 и 24 ч после облучения протонами по сравнению с РИ. Во многих работах продемонстрировано, что в ранние сроки после облучения РИ и протонами при облучении высокими дозами на фоне повышения уровней АФК регистрируется увеличение скорости апоптоза, количества двунитевых разрывов ДНК и экспрессии генов, определяющих радиочувствительность [29, 37]. Полученные нами данные указывают на специфическое участие антиоксидантной системы в формировании таких отдаленных биологических эффектов, как повреждение хромосом, при облучении мышей протонами в пике Брэг-

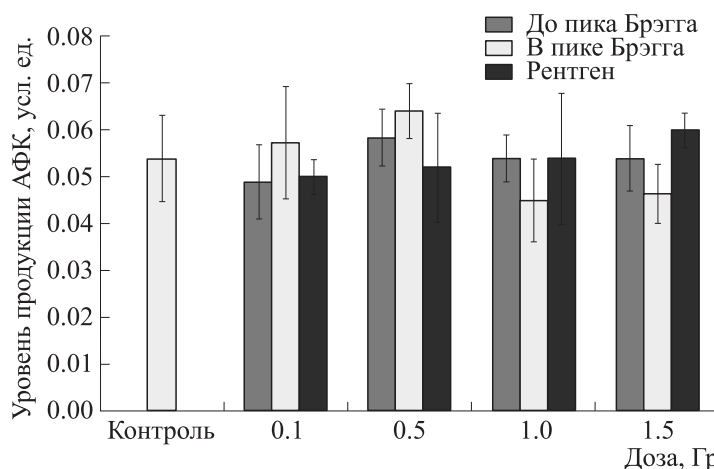


Рис. 5. Уровень спонтанной продукции АФК клетками крови мышей через 28 ч после облучения протонами до и в пике Брэгга и рентгеновским излучением в диапазоне доз 0.1–1.5 Гр.

га, начиная с очень малых доз облучения в отличие от РИ. Другой характер зависимости индекса активации от величины дозы наблюдался при облучении мышей ПИ до пика Брэгга: уровни этого показателя не отличались от необлученного контроля и вариантов, облученных всеми дозами РИ. Можно предположить, что динамика индукции АФК клетками крови при действии ПИ имеет сложный характер и затрагивает разные пути компенсации радикалов и активации внеклеточных и внутриклеточных АФК, которые зависят как от дозы, так и ЛПЭ протонов.

Таким образом, при тотальном облучении мышей с использованием нового способа доставки дозы с помощью сканирования тонким пучком протонов с разными значениями ЛПЭ в

диапазоне низких и средних доз были определены величины ОБЭ относительно РИ по критерию цитогенетических нарушений в эритроцитах костного мозга, равные 0.63 и 1.15. Выявлены органоспецифические различия в закономерностях патофизиологического действия на тимус и селезенку животных и состояния антиоксидантной системы клеток крови в зависимости от величины дозы и ЛПЭ протонов. Полученные результаты позволяют оценить дозовую нагрузку на критические органы и ткани системы кроветворения при облучении животных малыми и терапевтическими дозами высокоэнергетических протонов и оптимизировать с учетом рассчитанных значений ОБЭ планируемую дозу облучения при ПТ, скорректировать вклад ПИ в радиационную нагрузку

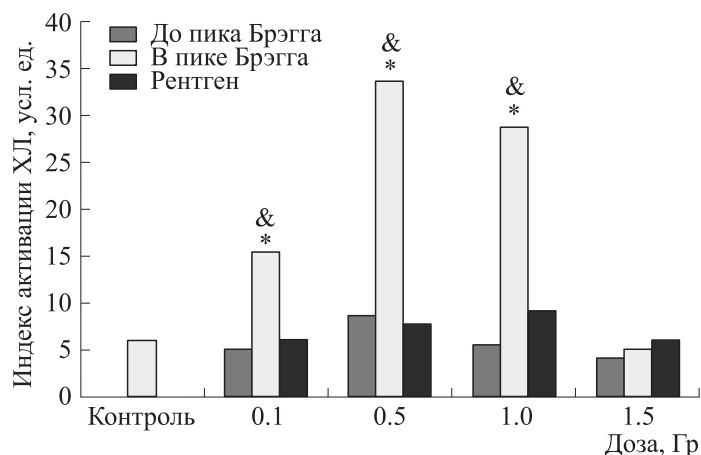


Рис. 6. Индекс активации хемилюминесценции в цельной крови мышей при облучении протонами до- и в пике Брэгга и рентгеновским излучением: * — статистически значимые отличия относительно необлученного контроля, & — статистически значимые отличия после облучения протонами в пике Брэгга относительно облучения до пика Брэгга и рентгеновским излучением ($p < 0.05$).

при космических полетах, создать радиобиологическое обоснование для расчета нагрузок для персонала центров ПТ и сотрудников предприятий, работающих со смешанными полями излучений.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках фундаментальных научных исследований по теме Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00224-24-03 при частичной финансовой поддержке за счет договора НИР № 09/22 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

План экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биобезопасности и биоэтике (протокол № 11 от 08.02.2023 г.), все процедуры проводились в соответствии с нормативно-правовыми актами, касающимися экспериментов на животных и гуманного обращения с животными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wu Y. Y. and Fan K. H. Proton therapy for prostate cancer: current state and future perspectives. *Br. J. Radiol.*, **95** (1131), 20210670 (2022). DOI: 10.1259/bjr.20210670
- Mutter R. W., Choi J. I., Jimenez R. B., Kirova Y. M., Fagundes M., Haffty B. G., Amos R. A., Bradley J. A., Chen P. Y., Ding X., Carr A. M., Taylor L. M., Pankuch M., Vega R. B. M., Ho A. Y., Nyström P. W., McGee L. A., Urbanic J. J., Cahlon O., Maduro J. H., and MacDonald S. M. Proton therapy for breast cancer: a consensus statement from the particle therapy cooperative group breast cancer subcommittee. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **111** (2), 337–359 (2021). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2021.05.110
- Gordon K. B., Smyk D. I., and Gulidov I. A. Proton therapy in head and neck cancer treatment: state of the problem and development prospects (review). *Sovrem. Tekhnologii Med.*, **13** (4), 70–80 (2021). DOI: 10.17691/stm2021.13.4.08
- Schippers J. M. and Lomax A. J. Emerging technologies in proton therapy. *Acta Oncol.*, **50** (6), 838–850 (2011). DOI: 10.3109/0284186X.2011.582513
- Mohan R. and Grosshans D. Proton therapy – present and future. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **109**, 26–44 (2017). DOI: 10.1016/j.addr.2016.11.006
- Rithidech K. N., Honikel L. M., Reungpatthanaphong P., Tungjai M., Golightly M., and Whorton E. B. Effects of 100 MeV protons delivered at 0.5 or 1 cGy/min on the *in vivo* induction of early and delayed chromosomal damage. *Mutat. Res.*, **756** (1–2), 127–140 (2013). DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.06.001
- Ушаков И. Б. *Космос. Радиация. Человек (Радиационный барьер в межпланетных полетах)* (Научная книга, М., 2021).
- Chang J., Feng W., Wang Y., Luo Y., Allen A. R., Kotturbash I., Turner J., Stewart B., Raber J., Hauer-Jensen M., Zhou D., and Shao L. Whole-body proton irradiation causes long-term damage to hematopoietic stem cells in mice. *Radiation research*, **183** (2), 240–248 (2015). DOI: 10.1667/RR13887.1
- Skelly A., Brodt E., and Schwartz N. *Proton beam therapy – re-review. Final evidence report* (WA – Health Technology Assessment, 2019), p. 301.
- Sørensen B. S., Pawelke J., Bauer J., Burnet N. G., Dasu A., Høyer M., Karger C. P., Krause M., Schwarz M., Underwood T. S. A., Wagenaar D., Whitfield G. A., and Lühr A. Does the uncertainty in relative biological effectiveness affect patient treatment in proton therapy? *Radiotherapy and Oncology*, **163**, 177–184 (2021). DOI: 10.1016/j.radonc.2021.08.016
- Paganetti H., Blakely E., Carabe-Fernandez A., Carlson D. J., Das I. J., Dong L., Grosshans D., Held K. D., Mohan R., Moiseenko V., Niemierko A., Stewart R. D., and Willers H. Report of the AAPM TG-256 on the relative biological effectiveness of proton beams in radiation therapy. *Med. Physics*, **46** (3), 53–78 (2019). DOI: 10.1002/mp.13390
- Lühr A., von Neubeck C., Krause M., and Troost E. G. C. Relative biological effectiveness in proton beam therapy – Current knowledge and future challenges. *Clin. Translat. Rad. Oncol.*, **9**, 35–41 (2018). DOI: 10.1016/j.ctro.2018.01.006
- Bao C., Sun Y., Dong Y., Le Z., Lin L. C., Kong L., and Lu J. J. The relative biological effectiveness of proton and carbon ion beams in photon-sensitive and resistant nasopharyngeal cancer cells. *Translat. Cancer Res.*, **7** (1), 170–179 (2018). DOI: 10.21037/tcr.2018.01.25
- Deymar S., Faccin E., Kazimova T., Knobel P. A., Telarovic I., Tschanz F., Waller V., Winkler R., Yong C., Zingariello D., and Pruschy M. The relative biological effectiveness of proton irradiation in dependence of DNA damage repair. *Br. J. Radiol.*, **93** (1107), 20190494 (2020). DOI: 10.1259/bjr.20190494
- Tang F. R. and Loke W. K. Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.*, **91** (1), 13–27 (2015). DOI: 10.3109/09553002.2014.937510
- Finnberg N., Wambi C., Ware J. H., Kennedy A. R., and El-Deiry W. S. Gamma-radiation triggers a unique gene expression profile associated with cell death compared to proton radiation in mice *in vivo*. *Cancer Biol. Therapy*, **7** (12), 2023–2033 (2008). DOI: 10.4161/cbt.7.12.7417
- Smith J. A., van den Broek F. A., Martorell J. C., Hackbarth H., Ruksenas O., and Zeller W. FELASA working

- group on ethical evaluation of animal experiments, 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. Animals*, **41** (2), 143–160 (2007).
18. Директива 2010/63/еу Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях (Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными», рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы, СПб, 2012).
 19. Zaichkina S. I., Kondakova N. V., Rozanova O. M., Aptikaeva G. F., Akhmadieva A. Kh., Sakharova V. V., Ripa N. V., Kolkhir V. K., Sokol'skaya T. A., Rebrov L. B., and Bykov V. A. Radioprotector properties of biologically active substances in the range of medium and small radiation doses studied by means of the cytogenetic micronuclear test. *Pharmaceut. Chem. J.*, **38**, 405–410 (2004). DOI: 10.1023/B: PHAC.0000048900.86428.70
 20. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31** (1), 9–15 (1975). DOI: 10.1016/0165-1161(75)90058-8
 21. Zaichkina S. I., Klovov D. Yu., Rozanova O. M., Aptikaeva G. F., and Akhmadieva A. Kh. Deistvie mal'kikh doz gamma-radiatsii na tsitogeneticheskoe povrezhdenie v polikhromatofil'nykh éritrotsitakh kostnogo mozga myshei *in vivo* [Action of low doses of gamma-radiation on cytogenetic damage in polychromatophilic erythrocytes of bone marrow in mice *in vivo*]. *Genetika*, **34** (7), 1013–1016 (1998).
 22. Osipov A. N., Klovov D. Y., Elakov A. L., Rozanova O. M., Zaichkina S. I., Aptikaeva G. F., and Akhmadieva A. Kh. Comparison *in vivo* study of genotoxic action of high- versus very low dose-rate gamma-irradiation. *Nonlinearity in biology, toxicology, medicine*, **2** (3), 223–232 (2004). DOI:10.1080/15401420490507521
 23. Cherubini R., De Nadal V., and Gerardi S. Hyper-radiosensitivity and induced radioresistance and bystander effects in rodent and human cells as a function of radiation quality. *Radiat. Prot. Dosimetry*, **166** (1–4), 137–141 (2015). DOI:10.1093/rpd/ncv294
 24. Heuskin A. C., Michiels C., and Lucas S. Low dose hypersensitivity following *in vitro* cell irradiation with charged particles: Is the mechanism the same as with X-ray radiation? *Int. J. Radiat. Biol.*, **90** (1), 81–89 (2014). DOI:10.3109/09553002.2013.835503
 25. Tommiansino F. and Durante M. Proton radiobiology. *Cancers*, **7**, 353–381 (2015).
 26. Calugaru V., Nauraye C., Noël G., Giocanti N., Favaudon V., and Méglin-Chanet F. Radiobiological characterization of two therapeutic proton beams with different initial energy spectra used at the Institut Curie Proton Therapy Center in Orsay. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **81** (4), 1136–1143 (2011). DOI:10.1016/j.ijrobp.2010.09.003
 27. Koryakina E., Troshina M., Potetnya V., Koryakin S., Baykuzina R., and Golovanova O. Biological efficiency of a scanning proton beam under different irradiation modes *in vitro*. In: *Abstr. Book of Eighth Int. Conf. on Radiation in Various Fields of Research* (Virtual conference, 2020), p. 125.
 28. Spadinger I. and Palcic B. The relative biological effectiveness of ^{60}Co gamma-rays, 55 kVp X-rays, 250 kVp X-rays, and 11 MeV electrons at low doses. *Int. J. Radiat. Biol.*, **61** (3), 345–353 (1992). DOI:10.1080/09553009214551031
 29. Иванов А. А., Бычкова Т. М., Никитенко О. В. и Ушаков И. Б. Радиобиологические эффекты протонов. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*, **64** (3), 19–31 (2019). DOI: 10.12737/article_5cf2306a3b26d6.36140627
 30. Balakin V. E., Rozanova O. M., Smirnova E. N., Belyakova T. A., Shemyakov A. E., and Strelnikova N. S. Assessment of the relative biological efficiency of pencil beam scanning of protons in mice *in vivo*. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **499** (1), 215–219 (2021). DOI: 10.1134/S1607672921040037
 31. *Биофизические основы действия космической радиации и излучений ускорителей*, под ред. Жуковской Н. Е. и Черножуковой Е. М. (Проблемы космической биологии, т. 60) (Наука, Л., 1989).
 32. Бекетов Е. Е., Исаева Е. В., Наседкина Н. В., Соловьев А. Н., Голованова О. Ю., Ульяненко Л. Н., Малахов Е. П., Кисель А. А., Ульяненко С. Е., Шегай П. В., Иванов С. А. и Каприн А. Д. Равномерность биологической дозы в распределенном пике Брэгга терапевтической установки со сканирующим пучком протонов. *Вопросы онкологии*, **65** (4), 532–536 (2019).
 33. Feola J. M., Hwang H. N., Beach J. L., and Maruyam Y. Relative biological effectiveness of ^{252}Cf radiation as estimated by thymus weight loss. *J. Radiat. Res.*, **26** (1), 140–149 (1985). DOI: 10.1269/jrr.26.140
 34. Gridley D. S., Pecaute M. J., and Nelson G. A. Total-body irradiation with high-LET particles: acute and chronic effects on the immune system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **282** (3), 677–688 (2002). DOI: 10.1152/ajpregu.00435.2001
 35. Шалгимбаева Г. С., Жетписбаева Х. С., Адрисова К. С., Жетписбаев Б. А. и Куанышева А. Г. Алимбаева А. А. Отдаленные эффекты малой дозы гамма-излучения на лимфоидные органы иммуногенеза. *Наука и здравоохранение*, **4**, 46–48 (2014).
 36. Giedzinski E., Rola R., Fike J. R., and Limoli C. L. Efficient production of reactive oxygen species in neural precursor cells after exposure to 250 MeV protons. *Radiat. Res.*, **164** (4, Pt 2), 540–544 (2005). DOI: 10.1667/rr3369.1
 37. Narang H., Kumar A., Bhat N., Pandey B. N., and Ghosh A. 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. *Mutation Res.*, **780**, 35–46 (2015). DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2015.07.006

Features of the Effects of Exposure to 90–170 MeV Proton Radiation on the Blood-Forming Organs in Mice under Total Irradiation with Proton Pencil Scanning Beam Depending on the Linear Energy Transfer of Particles

O.M. Rozanova*, T.A. Belyakova*, E.N. Smirnova*, S.S. Sorokina*, A.R. Dyukina*, A.E. Shemyakov*, **, and N.S. Strelnikova**

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

***Branch “Physical-Technical Center” of P.N. Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Mira 1N, Protvino, Moscow Region, 142281 Russia*

The effects on induction of cytogenetic damage to mouse bone marrow, generation of reactive oxygen species by whole blood cells, and on the thymus and spleen from exposure of mice to total-body proton radiation before and at the Bragg peak with a dose deposition of 0.1–1.5 Gy were investigated depending on the linear rate of energy loss. It was found that the level of polychromatophilic erythrocytes with micronuclei at all doses of proton radiation at the Bragg peak with the linear energy transfer 2.5 keV/μm was close to that of polychromatophilic erythrocytes with micronuclei for the corresponding doses of X-ray radiation with the linear rate of energy loss 2.0 keV/μm, and the level of cytogenetic damage induced by exposure to proton radiation up to the Bragg peak with the linear energy transfer 0.7 keV/μm was significantly lower. The coefficient of the relative biological effectiveness of proton irradiation calculated from the linear energy transfer by estimating micronuclei frequency at and before the Bragg peak was 1.15 and 0.63, respectively. Organ-specific differences in the patterns of pathophysiological effects on the thymus, spleen of mice and the state of the antioxidant system of blood cells depending on the linear energy transfer of protons were revealed by varying radiation doses.

Keywords: protons, linear energy transfer, micronuclei, thymus, spleen, ROS, mice