

УДК 577.3:599.323.4

ИНДУКЦИЯ РОСТА СОЛИДНОЙ ФОРМЫ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ ПРОТОНАМИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *EX VIVO*

© 2023 г. Член-корреспондент РАН В. Е. Балакин¹, О. М. Розанова², Е. Н. Смирнова²,
Т. А. Белякова¹, Н. С. Стрельникова^{1,*}, А. В. Смирнов¹, А. Е. Шемяков¹

Поступило 28.02.2023 г.

После доработки 21.03.2023 г.

Принято к публикации 21.03.2023 г.

Представлены данные исследования скорости роста и частоты индукции солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей в короткие и отдаленные сроки после инокуляции асцитных клеток, облученных *ex vivo* пучком протонов в диапазоне доз 30–150 Гр. Было показано, что скорость роста солидной опухоли, после инокуляции облученных клеток *ex vivo* совпадала с ростом опухолей контрольной группы. Частота индукции опухолей у мышей с перевитыми клетками АКЭ, облученными в дозе 30 Гр, составила 80%, 60 Гр – 60%, 90 Гр – 25%, 120 Гр – 10%, а при облучении в дозе 150 Гр в течение всего периода наблюдения опухоли не появилась. Таким образом, нам удалось определить дозу протонного излучения, необходимую для элиминации опухолевых клеток и/или сигнальных факторов, способных привести к индукции роста солидной АКЭ у мышей.

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

DOI: 10.31857/S2686738923600152, **EDN:** JBXVTE

В последние годы наиболее перспективным и активно развивающимся среди методов лучевой терапии является протонная терапия (ПТ), которая успешно используется для лечения различных опухолей. К настоящему моменту 85% всех пациентов, получивших лечение с помощью адронной терапии, прошли курсы именно ПТ. Преимущества ПТ связаны с особенностями дозового распределения энергии протонов при прохождении в тканях: относительно низкой дозой на входе и наличием пика Брэгга – максимального энерговыделения в конце пробега частицы и, что особенно важно, его полное отсутствие после пика. Значение относительной биологической эффективности (ОБЭ) для протонов, на основании которого в настоящее время планируются дозы для ПТ в клиниках, равно 1.1 [1]. Нами при определении значения ОБЭ протонов при облучении мышей *in vivo* в диапазоне низких (0.1–1 Гр), те-

рапевтических (2 Гр) и сублетальных (4.5–12.5 Гр) доз также была определена величина ОБЭ, близкая к 1, при облучении до и в пике Брэгга [2, 3]. Поскольку наблюдается хорошее совпадение литературных данных при определении величины ОБЭ, полученных *in vivo* и *in vitro* [4], можно предположить, что эксперименты *ex vivo* могут служить удобной и полезной моделью для подбора доз и исследования механизмов рецидивирования опухолей, а также поиска методов их предотвращения. В настоящее время в центрах ПТ все чаще используют технологию тонкого сканирующего пучка, который обеспечивает баллистически точную выгрузку дозы протонов в опухоли, максимально снижая повреждение здоровых тканей. Несмотря на совершенствование методов радиотерапии, у значительной части пациентов наблюдаются рецидивы, вторичные опухоли или формирование резистентности к терапии [5], в связи с чем идет активный поиск новых способов воздействия на причины рецидивирования с использованием возможностей ПТ. Ранее нами на модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей была показана возможность олиго- и гиподифракционированного облучения протонами в дозах 30, 40, 60, 80 Гр, которые не только полностью подавляли рост первичной опухоли, но и снижали частоту рецидивирования этой опухоли [6].

¹Филиал “Физико-технический центр” Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физического института им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, Протвино, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

*e-mail: strelnikova.ns@lebedev.ru

Таблица 1. Частота индукции опухолей у мышей в течение месяца после инокуляции клеток АКЭ, облученных протонами в дозах 30–150 Гр

Доза облучения	Количество мышей с опухолями, %				
	7 сут	14 сут	21 сут	28 сут	35 сут
0 Гр	100	100	100	100	100
30 Гр	0	20	45	50	65
60 Гр	0	5	30	35	55
90 Гр	0	0	10	25	25
120 Гр	0	0	5	5	5
150 Гр	0	0	0	0	0

В настоящее время принципиально меняются представления о возникновении, росте, метастазировании и рецидивировании опухолей в связи с тем, что их критическим компонентом считают небольшой пул (0.01–4%) опухолевых стволовых клеток (ОСК) [7]. 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 самообновлению. ОСК в отличие от опухолевых и неопухолевых клеток, входящими в структуру опухоли, также проявляют повышенную устойчивость к химиотерапии и радиотерапии за счет специфических поверхностных маркеров, профилей генной экспрессии, интенсивного удаления лекарственных препаратов и механизмов репарации [8].

Целью данной работы являлось изучение скорости роста и частоты индукции солидной формы АКЭ у мышей в короткие и отдаленные сроки после инокуляции асцитных клеток, облученных *ex vivo* пучком протонов в диапазоне доз 30–150 Гр.

Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах мышей колонии SHK (31–35 г), которых содержали в стандартных условиях вивария [9]. Дизайн эксперимента был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 36 от 15.03.2022). В качестве модели опухоли была использована асцитная форма АКЭ. Линия опухолевых клеток получена в НМИЦ им. Н.Н. Блохина (Москва, Россия). Клетки АКЭ поддерживали *in vivo* в форме асцита у мышей SHK путем серийной внутрибрюшинной перевивки. Для эксперимента клетки АКЭ в асептических условиях выделяли из мышей-опухоленосителей на седьмой день после инокуляции АКЭ. Для подсчета количества клеток в камере Горяева суспензию трижды промывали фосфатно-солевым буфером с помощью центрифугирования при 500 об/мин в течение 5 мин. Жизнеспособность клеток АКЭ после выделения, опре-

деленная с помощью окрашивания трипановым синим, составляла около 99%. Опухолевые клетки ресуспендировали в физрастворе до концентрации 20×10^6 клеток/мл и помещали в эпепендорфы объемом 1.5 мл.

Источником протонного излучения служил синхротрон комплекса ПТ ФТЦ ФИАН (Протвино). Эпепендорф с суспензией клеток АКЭ помещали в водный фантом, проводили конусную лучевую томографию для определения облучаемого объема и в специально разработанной трехмерной планирующей системе составляли план облучения. Облучение клеток протонами (84–101 МэВ) в модифицированном пике Брэгга проводили с одного направления сканирующим пучком по всему заданному объему при комнатной температуре в дозах 30–150 Гр. После облучения экспериментальным и контрольным мышам внутримышечно вводили 2×10^6 клеток АКЭ в бедро левой лапы. В каждой группе было 10 мышей, и проведено по 2–3 повторных эксперимента. После инокуляции клеток АКЭ наблюдали за частотой индукции солидных опухолей и скоростью их роста. Размеры опухолей измеряли еженедельно в течение месяца после их появления и вычисляли объемы по стандартной методике [10]. Для статистической оценки значимости различий применяли *t*-критерий Стьюдента и непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что у всех мышей, которым были введены необлученные клетки, индуцировалась солидная опухоль, которая пальпировалась на 5-е сутки ($\sim 0.4 \text{ см}^3$) и через 35 сут достигла стандартного для этой модели объема 7.5 см^3 . В группах мышей, которым были инокулированы облученные *ex vivo* клетки, наблюдали появление опухолей у отдельных животных с задержками начала роста АКЭ. В группах после облучения клеток в дозах 30 и 60 Гр время начала роста опухолей наблюдали на 14 сут, но частота индукции опухолей различалась, однако к концу месяца этот показатель достоверно не отличался. В группах 90 и 120 Гр появление опухолей наблюдали на 21 сут, но на 35 сут в группе 120 Гр новых случаев опухолей не фиксировали в отличие от группы 90 Гр. В группе 150 Гр в течение месяца после облучения индукции опухолей не наблюдали (табл. 1).

Затем наблюдали за скоростью роста опухолей у мышей, начиная с объема 0.4 см^3 . На рис. 1 представлена динамика роста опухолей в контрольных и экспериментальных группах мышей. Было обнаружено, что после появления опухолевого узла в месте инокуляции облученных клеток скорость роста опухоли не отличалась от таковой в контрольной группе, что свидетельствует об индукции опухоли той же этиологии. Возможно, что

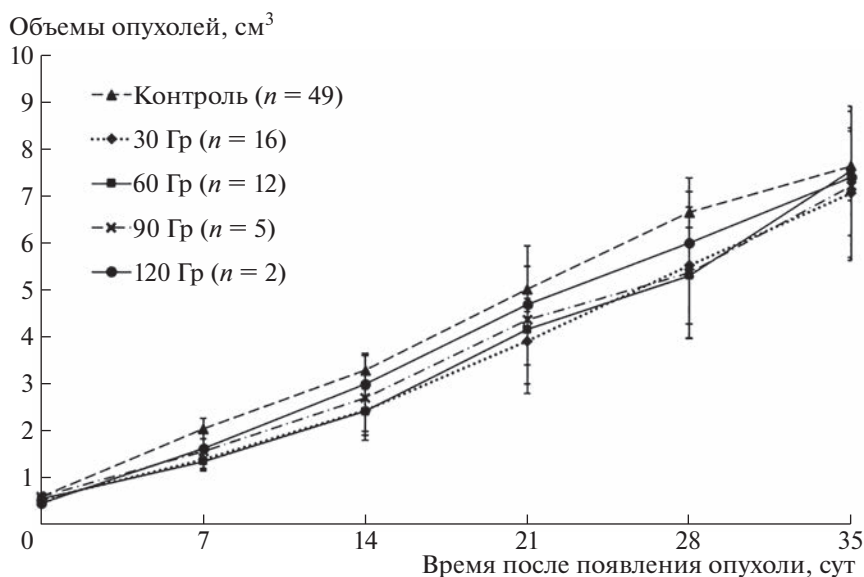


Рис. 1. Динамика роста опухолей у мышей после инокуляции суспензии клеток АКЭ, облученных в диапазоне доз 30–120 Гр. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD, $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем.

к моменту начала роста опухоли выжившие ОСК, преодолев иммунный контроль организма, дифференцировались и пролиферировали до стартового количества опухолевых клеток, который необходим для индукции роста АКЭ с той же скоростью.

На рис. 2 представлена динамика индукции опухолей у мышей после инокуляции облученных клеток АКЭ за все время наблюдения. У мышей с перевитыми клетками АКЭ, облученными в дозе 30 Гр, у 80% возникали опухоли, в дозах 60 Гр частота индукции опухолей составила 60%, 90 Гр – 25%, 120 Гр – 10%, в группе после облучения 150 Гр в течение этого периода опухоли не появились. Интервал индукции опухолей составил 2–8 нед после инокуляции облученных клеток АКЭ, а далее количество опухолей не изменялось в течение 18 мес. Таким образом, мы выявили критический период времени после инокуляции облученных *ex vivo* опухолевых клеток, в течение которого возникают опухоли, причем длительность этого интервала не зависела от дозы в отличие от частоты индукции. Ранее нами при облучении солидной АКЭ у мышей *in vivo* в дозах 60 и 80 Гр однократно или за 2 фракции после полного подавления первичного опухолевого узла, возобновление роста опухолей той же локализации начинали фиксировать на 5-й неделе, а самые поздние рецидивы возникали даже через 8 мес после облучения [6]. Более длительный интервал, необходимый для индукции рецидивов после облучения солидной АКЭ *in vivo* у мышей по сравнению с динамикой возникновения АКЭ после введения облученных асцитных клеток *ex vivo* при тех же дозах, 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. Рядом авторов при облучении опухолевых клеток протонами *in vitro* показано, что показатели 10% выживаемости клеток достигаются в диапазоне доз 10–30 Гр [11, 12], а у некоторых линий наблюдается резистентность к действию протонов [13]. Мы предполагаем, что при нашем экспериментальном подходе облучение суспензии в сублетальных и летальных дозах протонов с последующей инкубацией в условиях функционирования нормального иммунитета организма приводит к гибели дифференцированных опухолевых клеток даже с учетом низкого значения ОБЭ для некоторых видов опухолей, и появление опухолей можно рассматривать как индукцию рецидивов. Опухоли возникали в той же локализации, динамика их роста совпадала с таковой после инокуляции 2 млн необлученных клеток, а патологоанатомическое исследование опухоли показало наличие характерной структуры солидной АКЭ. Появление рецидивов после облучения клеток *ex vivo* в сверхвысоких дозах подтверждает предположение, высказанное в работах других авторов о ключевой роли ОСК в рецидивировании после лучевой терапии и их радиорезистентности [14]. Рядом исследователей высказывается мнение, что эффективность действия новых методов радиотерапии необходимо оценивать по их действию на ОСК [15]. Показано, что абсолютное количество ОСК увеличивается после однократного облучения рентгеновскими лучами в дозах 1–10 Гр в культурах опухолевых клеток. При этом, если гибель опухо-

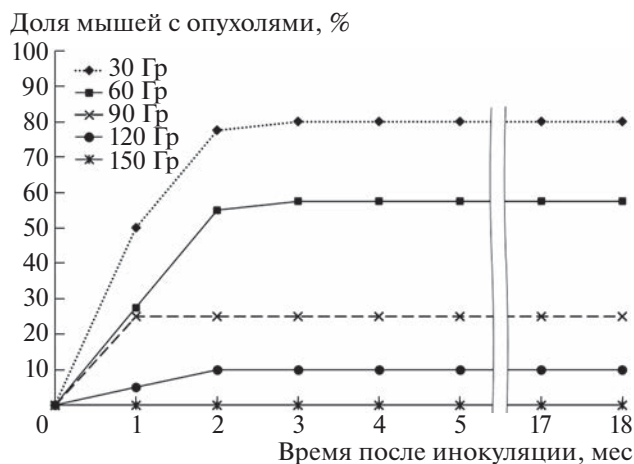


Рис. 2. Динамика появления опухолей у мышей после инокуляции клеток АКЭ, облученных протонами в дозах 30–150 Гр в течение всего периода наблюдения.

левых клеток растет с увеличением дозы облучения, то для ОСК происходит стимулирование деления, что приводит к развитию индуцированной радиорезистентности опухоли [16]. В литературе крайне мало данных о радиобиологических характеристиках ОСК, полученных при действии фотонов на опухоли *in vivo*, это связано со сложностью идентификации и локализации ОСК в разных опухолях. Экспериментальных результатов о закономерностях и механизмах действия протонов на ОСК еще меньше, но имеющиеся данные свидетельствуют о специфическом действии протонов в отличие от фотонов. В частности, в работе [17] было показано, что облучение протонами (3 МэВ) более эффективно уменьшало популяцию ОСК-подобных клеток карциномы легкого по сравнению с гамма-излучением, а экспрессия генов, ответственных за клеточную гибель, увеличивалась в 10 раз. Используя в нашей работе однократно экстремально высокие для выживаемости клеток дозы, равные величине суммарной дозы при конвенциональной радиотерапии, мы попытались оценить на модели облучения клеток АКЭ *ex vivo* достаточную “лимитирующую” дозу, при которой происходит не только полная гибель клеток опухоли, но и ингибирование сигнальных факторов и процессов, которые инициируют дифференцировку ОСК в опухолевые или их репопуляцию, что приводит к индукции роста опухоли у мышей.

Результаты наших экспериментов показали, что после облучения *ex vivo* асцитных клеток карциномы в дозе 150 Гр солидные опухоли у мышей не появлялись на протяжении всей жизни животных. Скорость роста опухолей после инокуляции суспензии АКЭ, облученной во всех дозах, не отличалась от таковой в контрольной группе. Временные закономерности возникновения рециди-

вов при облучении АКЭ *ex vivo* значительно отличались от облучения *in vivo*. Показано, что даже после облучения протонами асцитных клеток в дозах, сравнимых с общей очаговой дозой при радиотерапии (40–60 Гр), остается достаточное количество ОСК для образования рецидивов, что может служить еще одним свидетельством, что для развития опухоли достаточно нескольких клеток [18]. Регистрируемые опухоли являются интегральным показателем клеточной гибели, задержки деления клеток, стимулирования дифференцировки и пролиферации ОСК в условиях влияния микроокружения опухоли и иммунитета организма. Полученные результаты представляют интерес для понимания механизмов индукции рецидивов опухолей и способов их преодоления с использованием потенциала ПТ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-01027-22-00 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

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Исследования проводили в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (Federation of European laboratory animal science association, FELASA), а план экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 36 от 15.03.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paganetti H., Beltran C., Both S., et al. Roadmap: proton therapy physics and biology // *Phys Med Biol*. 2021. V. 66 05RM01.
2. Balakin V.E., Rozanova O.M., Smirnova E.N., et al. The effect of low and medium doses of pencil scanning proton beam on the blood-forming organs during total irradiation of mice // *Dokl Biochem Biophys*. 2020. V. 494. № 1. P. 231–234.
3. Balakin V.E., Rozanova O.M., Smirnova E.N., et al. Assessment of the relative biological efficiency of pencil beam scanning of protons in mice *in vivo* // *Dokl Biochem Biophys*. 2021. V. 499. № 1. P. 215–219.
4. Hirayama R., Uzawa A., Obara M., et al. Determination of the relative biological effectiveness and oxygen en-

- hancement ratio for micronuclei formation using high-LET radiation in solid tumor cells: An *in vitro* and *in vivo* study // *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015. V. 793. P. 41–47.
5. Warren J.L., Noone A.M., Stevens J., et al. The utility of pathology reports to identify persons with cancer recurrence // *Med Care*. 2022. V. 60. № 1. P. 44–49.
 6. Balakin V.E., Belyakova T.A., Rozanova O.M., et al. Study of early and remote effects of hypofractionated proton irradiation in a model of solid Ehrlich ascites carcinoma in mice // *Journal biomed*. 2021. V. 17. № S3. P. 127–132.
 7. Yin W., Wang J., Jiang L., Kang J. Cancer and stem cells // *Exp Biol Med* (Maywood). 2021. V. 246. № 16. P. 1791–1801.
 8. Chang J.C. Cancer stem cell role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance // *Medicine* (Baltimore). 2016. V. 95. № 1. P. 20–25.
 9. Smith J.A., van den Broek F.A.R., Martorell J.C., et al. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of the FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments // *Lab Anim*. 2007. V. 41. № 2. P. 143–160.
 10. Rozanova O.M., Smirnova E.N., Belyakova T.A., et al. Early and remote sequence effect of neutron and proton irradiation on the tumor response of solid Ehrlich carcinoma and skin reactions in mice // *Biophysics*. 2022. V. 67. № 5. P. 991–1001.
 11. Бекетов Е.Е., Исаева Е.В., Наседкина Н.В., и др. Биологическая эффективность сканирующего пучка протонов терапевтического комплекса “Прометейс” МРНЦ им. А.Ф. Цыба в исследованиях на культуре клеток мышиной меланомы В-16 // *Вопросы онкологии*. 2018. Т. 64. № 5. С. 678–682.
 12. Zavestovskaya I.N., Shemyakov A.E., Pryanichnikov A.A., et al. Expansion of the experimental facility and development of a technique for irradiating cell cultures, based on the proton therapy complex Prometheus // *Bulletin of the Lebedev Physics Institute*. 2022. V. 49. № 5. P. 145–150.
 13. Lee K.B., Lee J.S., Park J.W., et al. Low energy proton beam induces tumor cell apoptosis through reactive oxygen species and activation of caspases // *Exp Mol Med*. 2008. V. 40. № 1 P. 118–129.
 14. Yang L., Shi P., Zhao G., et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020. V. 5. № 1. P. 8.
 15. Замулаева И.А. Радиорезистентность популяции опухолевых стволовых клеток: механизмы, способы преодоления и клиническое значение. В сб.: Международной конференции “Актуальные проблемы радиационной биологии. К 60-летию создания Научного совета РАН по радиобиологии”; 25–27 октября 2022. Дубна; 2022. Доступно по <http://radbio.jinr.ru/index.php/conference2022>. Ссылка активна на 20 февраля 2023.
 16. Замулаева И.А., Матчук О.Н., Селиванова Е.И., и др. Увеличение количества опухолевых стволовых клеток под воздействием редкоионизирующего излучения // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014. Т. 54. № 3. С. 256–264.
 17. Narang H., Kumar A., Bhat N., et al. Effect of proton and gamma irradiation on human lung carcinoma cells: Gene expression, cell cycle, cell death, epithelial–mesenchymal transition and cancer-stem cell trait as biological end points // *Mutat Res*. 2015. V. 780. P. 35–46.
 18. Quintana E., Shackleton M., Sabel M.S., et al. Efficient tumor formation by single human melanoma cells // *Nature*. 2008. V. 456. № 7222. P. 593–598.

GROWTH INDUCTION OF SOLID EHRlich ASCITIC CARCINOMA IN MICE AFTER PROTON IRRADIATION OF TUMOR CELLS *EX VIVO*

Corresponding Member of the RAS V. E. Balakin^a, O. M. Rozanova^b, E. N. Smirnova^b, T. A. Belyakova^a, N. S. Strelnikova^{a, #}, A. V. Smirnov^a, and A. E. Shemyakov^a

^aBranch “Physical-Technical Center” of P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences, Protvino, Russian Federation

^bInstitute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

[#]e-mail: strelnikova.ns@lebedev.ru

This study presents data on the growth rate and frequency of induction of the solid form of Ehrlich’s ascitic carcinoma (EAC) in mice in the short and long term after inoculation of ascitic cells irradiated *ex vivo* with a proton beam in the dose range of 30–150 Gy. It was shown that the growth rate of solid tumors after inoculation of irradiated cells *ex vivo* coincided with the growth of tumors in the control group. The frequency of tumor induction in mice after inoculation EAC cells irradiated at a dose of 30 Gy was 80%, 60 Gy – 60%, 90 Gy – 25%, 120 Gy – 10%, and with irradiation at a dose of 150 Gy, no tumors appeared during the entire observation period. Thus, we were able to determine the dose of proton radiation required to eliminate tumor cells and/or signaling factors that can lead to the induction of tumor growth of EAC in mice.

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