

УДК 539.1.04

ОПТИМИЗАЦИЯ СТЕНДА И ОТРАБОТКА МЕТОДИКИ ОБЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР НА БАЗЕ КОМПЛЕКСА ПРОТОННОЙ ТЕРАПИИ “ПРОМЕТЕУС”

И. Н. Завестовская¹, А. Е. Шемяков¹, А. А. Пряничников^{1,3},
Д. Д. Колманович², М. А. Белихин^{1,3}, Д. С. Петруня¹, А. Л. Попов^{1,2}

Показаны работы по оптимизации экспериментального стенда и отработке методики анализа биологических эффектов облучения клеточных культур сканирующим протонным пучком терапевтического диапазона энергий. Представлены результаты исследований воздействия протонного излучения на опухолевые клетки аденокарциномы человека линии MCF-7. В рамках исследования проведен подбор оптимальной дозы облучения, времени экспозиции после облучения, плотности посева клеточной культуры и методики оценки жизнеспособности. В качестве источника излучения был использован комплекс протонной терапии “Прометеус”. Было выявлено, что метод МТТ-теста не подходит для анализа биологических эффектов воздействия протонного пучка, а анализ клоногенной активности дает наиболее воспроизводимые и статистически достоверные результаты.

Ключевые слова: протонная терапия, сканирующий пучок, аденокарцинома, опухолевые клетки.

Введение. При использовании протонной терапии важно достижение высокой точности и конформности доставки дозы в опухоль, особенно при облучении мишеней вблизи критических органов и структур. Наличие пика Брэгга – характерного энерговыделения в конце пробега заряженных частиц, частично решает эту проблему, позволяя создавать

¹ ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский пр-т, 53; e-mail: pryanchnikov.al@gmail.com.

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Россия, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, 3.

³ МГУ им. М. В. Ломоносова, 119991 Россия, Москва, Ленинские горы, 1.

высокие градиенты доз на краях опухоли [1]. Однако остаются случаи радиорезистентных образований, когда даже высокая точность облучения и резкие границы доз на краях не позволяют достичь желаемого терапевтического эффекта. В таких случаях возможно применение комбинированных технологий, основанных на синергетическом действии различных видов ионизирующих излучений или специальных радиосенсибилизаторов.

Возможными вариантами радиосенсибилизации клеток опухоли при протонной терапии является использование наноформуляций. В этом случае вторичное излучение с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ), возникающее при активации наноструктур протонным пучком, может вызывать увеличение доли двунитевых разрывов ДНК, что, в свою очередь, приводит к гибели патогенных клеток [2]. Также возможно увеличение радиочувствительности клеток за счет доставки в тело опухоли препаратов, содержащих наночастицы металлов с высоким атомным номером ($Z > 52$). Данный подход показал свою эффективность в экспериментах, и в настоящее время проводятся клинические испытания с наночастицами на основе металлов различных типов: ПЭГ-наночастицы золота [3], AuIX – гадолиниевые полисилоксановые наночастицы [4], NBTXR3 – наночастицы на основе оксида гафния [5].

Однако для проведения исследовательских работ по изучению радиосенсибилизации необходимо наличие экспериментального стенда с возможностью создания однородного поля облучения заданных размеров с высокой воспроизводимостью от эксперимента к эксперименту. Также требуются отработанные методики анализа радиационных повреждений клеточных культур. В данной работе представлена валидация методики облучения клеточных культур сканирующим пучком протонов на комплексе протонной терапии (КПТ) “Прометеус” для последующего использования данной технологии для определения радиомодифицирующих свойств различных веществ.

ФТЦ ФИАН совместно с МРНЦ им. А. Ф. Цыба накопили семилетний опыт использования комплекса в клинических условиях, а результаты показали эффективность и надежность установки при лечении опухолей головного мозга, головы и шеи [6]. Несмотря на все большее использование технологий протонной терапии в мире, еще не решена задача использования всего потенциала протонных пучков в клинической практике. Так, например, ведутся работы по определению зависимости терапевтического эффекта протонов от мощности доставки дозы, коэффициентов ЛПЭ и т. п. На КПТ “Прометеус” непрерывно проводятся работы по поиску оптимальных режимов облучения опухолей на модели лабораторных животных и поиск сочетанных методов лечения [7,

8]. В настоящее время готовятся работы по изучению перспективных технологий на основе бинарных ядерно-физических методов.

Материалы и методы. Облучение сканирующим пучком протонов проводилось на КПТ “Прометеус”. Комплекс представляет собой компактный протонный синхротрон, способный ускорять протоны в диапазоне энергии 30–330 МэВ [9]. По своим характеристикам КПТ значительно превосходит установки ведущих мировых лидеров: малая масса, низкое энергопотребление и компактные размеры позволяют размещать комплекс в обычных больницах, не возводя отдельные здания. Высокая точность выбора энергии делает возможным планирование процедуры облучения с субмиллиметровой точностью [10, 11]. Энергия в 330 МэВ делает возможным использование комплекса для протонной томографии. Эта новейшая экспериментальная разработка способна сделать протонную терапию более точной [12].

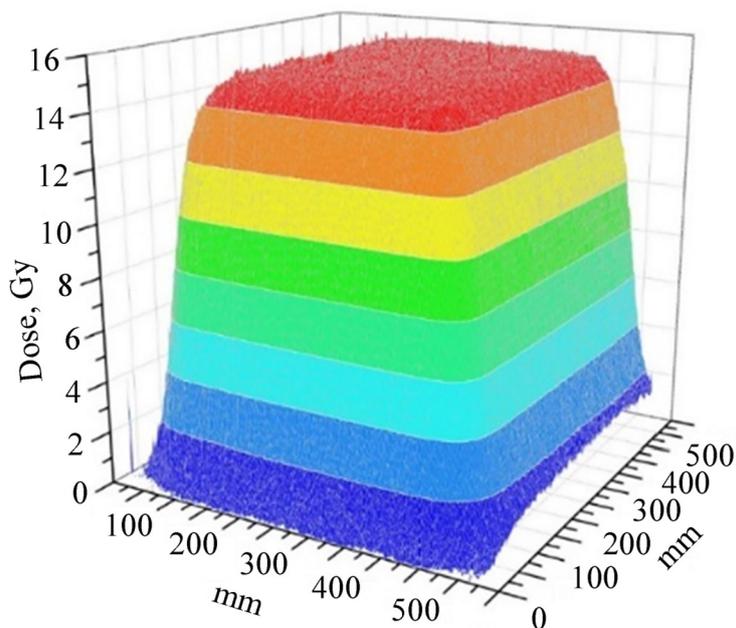


Рис. 1: Дозовое распределение в зоне облучения, полученное при помощи пленки ЕВТЗ.

Для отработки и валидации методики облучения клеток для последующего применения в рамках сенсбилизации протонной терапии, были проведены экспериментальные исследования жизнеспособности клеточной культуры аденокарциномы человека линии MCF-7 после воздействия пучков протонов в различных дозах. Для облучения клеток было сформировано однородное дозовое поле размером $40 \times 60 \text{ мм}^2$ при энергии пучка протонов 150 МэВ. Для всех групп были рассчитаны планы с соответствующей дозой от

1.5 до 15 Гр. Однородность дозы и размер поля контролировались при помощи радиометрической пленки ЕВТЗ, а поглощенная доза – электрoметром РТW Unidos weblіne с ионизационной камерой РТW PinPoint 3D Chamber 31022. Графическое представление дозы с пленки ЕВТЗ продемонстрировано на рис. 1. На уровне 95%-ой изодозы однородность составляла не менее 98%. Точность определения дозы в области облучения клеток составила 3%.

Флаконы с культурой клеток располагались стоя на расстоянии 80 см от раструба выводного канала ускорителя на специальной подставке из вспененного полиэтилена для минимизации вторичного излучения, как показано на рис. 2. Облучение осуществлялось последовательно по одному флакону. При переходе от одной дозовой группы к другой проводился повторный контроль дозы.



Рис. 2: Расположение флаконов с клетками во время облучения.

Эксперименты проводились на клеточной культуре клеток аденокарциномы человека линии MCF-7. Культивирование клеток проводилось в культуральной среде ДМЕМ/Ф12+10% телячьей сыворотки (ЭТС) при 5% CO₂ и 95% влажности. Клетки высевались в культуральные матрасы для анализа на клоногенную активность и МТТ-тест. Для анализа апоптоза и ядерного аппарата, а также фенотипических характеристик клеток после облучения клетки высевались в 8-луночные слайд-флаконы (SPL, Korea). Перед облучением флаконов и слайдов они полностью заполнялись культуральной средой, не содержащей сыворотки, а крышки фиксировались парафильмом.

Облучение слайд-флаконов проводилось по схеме, аналогичной облучению флаконов. Культуры клеток содержали в термостате при температуре 37 °С на этапе облучения.

После облучения протонами в дозах 1.5–15 Гр был проведен анализ клоногенной активности и анализ выживаемости методом МТТ-теста. Количественный анализ доли апоптотических (погибающих) клеток (селективный краситель Yo/Pro1), анализ микроморфологии ядерного аппарата (окраска Хехст 33342), соотношения живых и мертвых клеток (Live/Dead assay) были проведены после облучения в дозе 1.5 и 5 Гр.

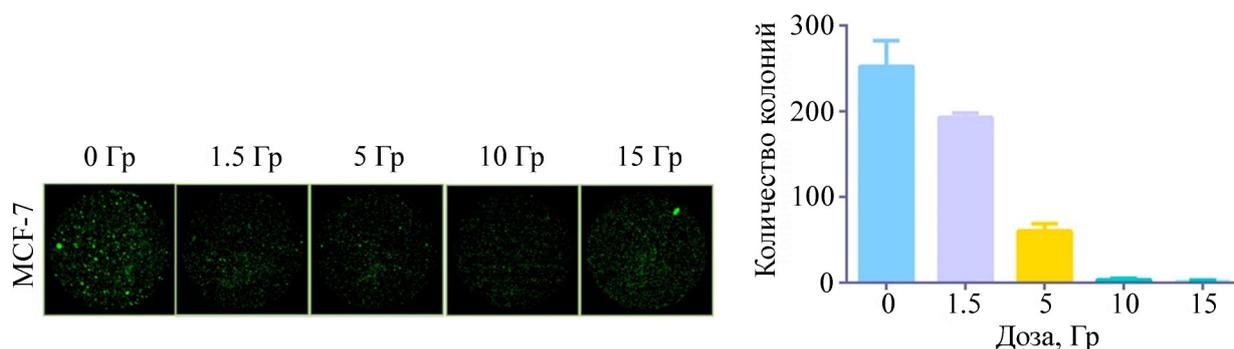


Рис. 3: Анализ дозовой зависимости образования колоний клеток MCF-7 после облучения в дозах от 1.5 до 15 Гр. Анализ колоний клеток MCF-7 через 10 дней после облучения с помощью планшетного ридера Clone Select Imager (слева). Количественный анализ клоногенной активности (справа).

Результаты. На первом этапе была проведена оценка дозовой нагрузки на клоногенную активность клеток аденокарциномы человека (рис. 3). Показано, что облучение культуры в дозе 1.5 Гр уже приводит к заметному снижению способности образовывать колонии, при этом большие дозы (10 и 15 Гр) приводили к полному ингибированию деления клеток. Таким образом, нами была определена оптимальная доза в 5 Гр для последующего анализа в присутствии различных нанорадиосенсибилизаторов.

Далее был проведен анализ метаболической активности (МТТ-тест) клеточной культуры линии MCF-7 через 48 и 72 часа после облучения протонами в различных дозах (рис. 4). Показано, что через 48 часов после облучения достоверное снижение метаболической активности клеток наблюдается, начиная с дозы 5 Гр. При этом стоит отметить, что высокие дозы (от 5 до 15 Гр) не вызывали значительного снижения метаболической активности клеток, которая является основным характерным параметром для данного метода исследования. Максимальная доза 15 Гр приводила к снижению до $43\% \pm 3.2$ жизнеспособности (метаболической активности) через 48 часов после воздей-

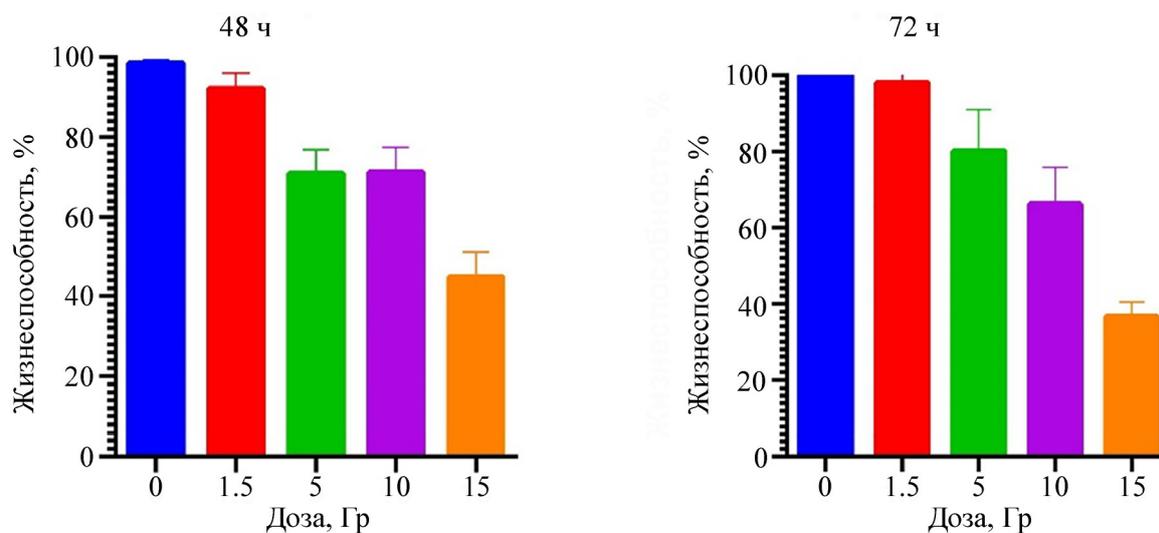


Рис. 4: Результаты МТТ-теста культуры клеток аденокарциномы человека линии MCF-7 через 48 и 72 часа после облучения пучками протонов в различных дозах (1.5–15 Гр).

ствия. Анализ жизнеспособности через 72 часа демонстрирует аналогичную картину метаболической активности. Максимальная доза в 15 Гр снижала данный параметр до $38\% \pm 2.1$ относительно необлученной группы. Более низкие дозы 5 и 10 Гр приводили к незначительному снижению жизнеспособности клеточной культуры аденокарциномы человека.

Был проведен детальный анализ микроморфологии и количества мёртвых и апоптотических клеток методом флуоресцентной микроскопии с использованием ряда селективных красителей. Был использован краситель Хехст 33342, который окрашивает ядра клеток, что позволяет оценивать микроморфологию ядерного аппарата после его повреждения пучком протонов или как результат развития апоптоза. Для оценки соотношения живых и мертвых клеток в культуре использовали набор L-7007 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen), содержащий красители SYTO 9 (окрашивает все клетки, $\lambda = 485/498$ нм) и пропидий йодид (окрашивает ядра мертвых клеток, $\lambda = 535/617$ нм). Окраску клеток осуществляли путем замены культуральной среды DMEM/F12 с 5% ЭТС на среду, содержащую смесь красителей в концентрации 1 мкл/мл. Наблюдение за морфологией и флуоресцентной окраской проводили на инвертированном микроскопе LSM-510 (Carl Zeiss). Анализ апоптоза клеточной культуры проводили с использованием красителя YoPro1, который селективно проникает

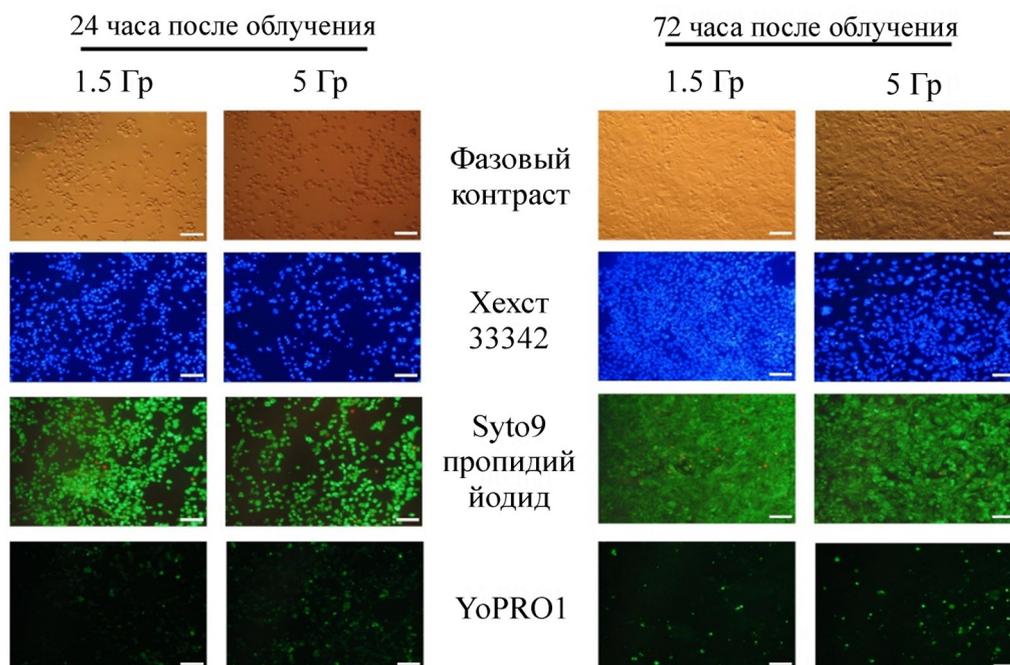


Рис. 5: Микрофотографии клеточной культуры аденокарциномы человека линии MCF-7 через 24 и 72 часа после облучения протонами в дозе 1.5 и 5 Гр. Окраска клеток с помощью Syto9, пропидиум йодид, Хехст 33342, Yo/Pro1. Увеличение 200×.

в апоптотические клетки. Показано, что дозы 1.5 и 5 Гр не приводят к значительному изменению морфологических особенностей клеточной культуры как через 24, так и через 72 часа инкубации после облучения (рис. 5). Анализ ядер клеток подтверждает значительные повреждения даже в дозе 1.5 Гр, которые выражаются в дефрагментации хроматина, появлении микроядер и многочисленных ядер клеток в конденсированном состоянии. Увеличение дозы до 5 Гр приводит к снижению числа клеток в культуре и незначительному изменению морфологических характеристик клеток через 24 часа после облучения, что характеризуется более округлой формой клеток, меньшей степенью распластанности и развитости филлоподии (отростков).

Заключение. Представлены результаты экспериментальных исследований воздействия протонов различных доз на клеточную культуру аденокарциномы человека. Были подобраны следующие экспериментальные параметры: оптимальная доза (5 Гр), время после облучения (72 часа для анализа апоптоза и 240 часов для клоногенного анализа), плотность посева (25–30 тыс/см²) и схема облучения протонами культуры клеток аденокарциномы человека линии MCF-7. Обнаружено, что метод МТТ-теста не подходит

для анализа жизнеспособности клеточной культуры после воздействия протонов, вносятся определенные артефакты. Наиболее оптимальным и валидированным методом для анализа воздействия пучка протонов является клоногенный анализ.

Полученные в ходе исследований результаты являются основой разработки бинарных технологий протонной терапии, основанных на использовании различных наноформуляций и наночастиц для сенсibilизации терапевтического действия излучения и возможной визуализации. Протонное облучение опухолевых клеточных культур в присутствии наночастиц или нанотераностиков на основе различных полуметаллов и металлов (напр., бора, гафния или висмута) позволит определить терапевтический эффект радиосенсibilизации протонной терапии наночастицами путем дальнейших биологических исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения № 075-15-2021-1347.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] A. P. Chernyaev, G. I. Klenov, A. Y. Bushmanov, et al., Proton Accelerators for Radiation Therapy Medical Radiology and radiation safety **2**, 11 (2019). DOI: 10.12737/article_5ca5a0173e4963.18268254.
- [2] G. A. P. Cirrone, L. Manti, D. Margarone, et al., Sci. Rep. **8**, 1141 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-19258-5.
- [3] S. K. Libutti, G. F. Paciotti, A. A. Byrnes, et al., Clin Cancer Res. **16**(24), 6139 (2010). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0978.
- [4] F. Lux, V. L. Tran, E. Thomas, et al., Br J Radiol. **92**(1093):20180365 (2019). DOI: 10.1259/bjr.20180365.
- [5] S. Bonvalot, C. Le Pechoux, T. De Baere, et al., Clin Cancer Res. **23**(4), 908 (2017). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1297.
- [6] A. A. Pryanichnikov, V. V. Sokunov, A. E. Shemyakov, Physics of Particles and Nuclei Letters **15**(7), 981 (2018). DOI: 10.1134/S1547477118070592.
- [7] V. E. Balakin, A. E. Shemyakov, S. I. Zaichkina, et al., Biophysics **62**, 138 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917010043.
- [8] V. E. Balakin, O. M. Rozanova, E. N. Smirnova, et al., Dokl. Biochem. Biophys. **498**(1), 159 (2021). DOI: 10.1134/S1607672921030017.

- [9] V. E. Balakin, V. A. Alexandrov, A. I. Bazhan, et al., Updated Status of Protom Synchrotrons for Radiation Therapy in Proc. RuPAC'21, Alushta, Russia, Sep.-Oct. 2021, pp. 120-123. DOI: 10.18429/JACOW-RUPAC2021-FRB05.
- [10] В. В. Сиксин, В. А. Рябов, А. Е. Шемяков, Краткие сообщения по физике ФИАН **48**(12), 16 (2021).
- [11] В. В. Сиксин, А. Е. Шемяков, Краткие сообщения по физике ФИАН **47**(9), 49 (2020). DOI: 10.3103/S1068335620090055.
- [12] A. A. Pryanichnikov, P. V. Zhogolev, A. E. Shemyakov, et al., J. Phys.: Conf. Ser. **2058**, 012041 (2021). DOI: 10.1088/1742-6596/2058/1/012041.

Поступила в редакцию 5 апреля 2022 г.

После доработки 10 апреля 2022 г.

Принята к публикации 11 апреля 2022 г.