

**МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ
1- β -D-АРАБИНОФУРАНОЗИЛЦИТОЗИНА
ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ПРОТОНАМИ КЛЕТОК
КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*
И *EX VIVO* НА РОСТ СОЛИДНОЙ ОПУХОЛИ
У МЫШЕЙ**

Т. А. Белякова^{а, 1}, О. М. Розанова^а, Е. Н. Смирнова^а,
Н. С. Стрельникова^б, Е. А. Красавин^в, А. В. Борейко^в

^а Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

^б Филиал «Физико-технический центр» Физического института им. П. Н. Лебедева РАН,
Протвино, Россия

^в Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

Исследовано модифицирующее действие 1- β -D-арабинофуранозилцитозина (АраЦ) при облучении протонами асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) в условиях *in vivo* и *ex vivo* на индукцию и рост солидных опухолей у мышей. Показано уменьшение скорости роста опухолей после облучения протонами в присутствии АраЦ как в условиях *in vivo*, так и *ex vivo*. Наиболее выраженные противоопухолевые эффекты АраЦ в комбинации с протонным излучением выявлены при облучении асцитных клеток *ex vivo*. Это может указывать на отличие в действии АраЦ на клетки, облучаемые *in vivo* и *ex vivo*, как на этапе первичного онкогенеза, так и в процессе развития сформировавшегося новообразования. Обсуждается влияние условий инкубации, облучения и концентрации АраЦ на величину радиосенсибилизирующего эффекта АраЦ.

The modifying effect of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine (AraC) upon irradiation with protons of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells under *in vivo* and *ex vivo* conditions on the induction and growth of tumors in mice was studied. A decrease in tumor growth rate after proton irradiation in the presence of AraC under both *in vivo* and *ex vivo* conditions has been shown. The most pronounced antitumor effects of AraC in combination with proton irradiation were revealed at irradiation of ascites cells *ex vivo*, which may indicate a difference in the effect of AraC on the cells, irradiated *in vivo* and *ex vivo*, both at the stage of primary oncogenesis and during development of the formed neoplasm, and it is also necessary to take into account the influence of incubation conditions, irradiation and concentration of AraC. The influence of incubation conditions, irradiation and AraC concentration on the magnitude of radiosensitizing effect of AraC is discussed.

PACS: 87.53.–j; 87.56.bd; 87.19.xj

¹E-mail: belyakovatanya@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания остаются одними из самых тяжелых и опасных для жизни человека. В связи с ростом числа этих заболеваний и высокой степенью рецидивирования некоторых из них актуальными остаются поиск новых мишеней для улучшения лучевой терапии (ЛТ) и разработка инновационных стратегий преодоления радиорезистентности опухолей. В последние годы наиболее перспективным и активно развивающимся методом ЛТ является протонная терапия (ПТ). 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 полного отсутствия после пика. Значение относительной биологической эффективности (ОБЭ) для протонов, на основании которого в настоящее время планируются дозы для ПТ в клиниках, равно 1,1 и является низким по сравнению, например, с ионами углерода [1]. Несмотря на низкое значение ОБЭ, сейчас уже сложилось понимание, что формирование конечных биологических эффектов при действии протонов реализуется за счет специфических молекулярных повреждений и механизмов, отличающихся от таковых при действии фотонных излучений, что открывает новые возможности для модификации первоначальных повреждений ДНК [2]. Для дальнейшего расширения областей применения и совершенствования ПТ в настоящее время разрабатываются подходы для усиления эффекта протонного излучения (ПИ), в частности, при использовании гипофракционированного режима облучения опухолей [3] и комбинировании с излучениями с высокими значениями ЛПЭ [4]. С появлением новых центров ПТ, в том числе и в нашей стране, накопились клинические данные о том, что наиболее перспективным направлением, в котором возможно максимально использовать преимущества сканирующего пучка протонов в ЛТ, является разработка и применение схем гипофракционирования с резким повышением однократной дозы облучения. Было проведено несколько клинических исследований по гипофракционированной ПТ раков простаты, печени и легких, в которых продемонстрирована не только высокая эффективность лечения, но и снижение показателей ранней и поздней токсичности, рецидивирования опухолей и повышение выживаемости пациентов по сравнению с конвенциональными схемами облучения [5].

Для усиления действия ПТ также применяются химические радиосенсибилизаторы с разными мишенями и механизмами действия [6], наиболее перспективными из которых являются ингибиторы репарации повреждений ДНК [7], которые увеличивают количество потенциально летальных повреждений в опухолевых клетках. При анализе литературных данных о механизме действия различных ингибиторов репарации, усиливающих действие фотонных излучений при ЛТ опухолей, как наиболее перспективном для исследования, для нашей работы был выбран ингибитор репарации двунитевых разрывов ДНК 1-β-D-арабинофуранозилцитозин (АраЦ). АраЦ является основным действующим веществом многих коммерческих препаратов (цитозар, алексан, цитарабин, цитостадин, цитарабин-ЛЭНС, цитастадин), которые давно и успешно используются в клинике при химиотерапии острых и хронических лейкозов [8], однако исследования этого соединения по-прежнему продолжают, поскольку при лечении большими дозами актуальной остается проблема острой токсичности и высокая

вероятность рецидивирования. АраЦ является интеркалирующим агентом и встраивается в концевое звено молекулы ДНК во время репарации, что ведет к нарушению процесса восстановления повреждений. Кроме того, АраЦ блокирует активность ДНК-полимераз α и β , участвующих в синтезе ДНК во время репарации, в результате чего происходит фиксация однонитевых разрывов ДНК и увеличение их количества. На нескольких культурах нормальных и опухолевых клеток при облучении различными видами излучений показано, что при репарации однонитевых разрывов ДНК в присутствии АраЦ образуются дополнительные двунитевые разрывы, которые имеют критическое значение для гибели клеток, т. е. специфика радиосенсибилизирующего действия АраЦ заключается в увеличении количества потенциально летальных повреждений ДНК в пострadiационный период [9]. В работах тех же авторов отмечается уменьшение модифицирующего влияния АраЦ с увеличением ЛПЭ при комбинированном воздействии с разными видами излучений [10]. При исследовании влияния АраЦ *in vivo* на рост меланомы у мышей было показано, что при комбинированном действии АраЦ и ПИ происходит уменьшение количества опухолевых клеток, опухоль становится более чувствительной к действию радиации и, что является особенно важным, при этом преодолевается радиорезистентность опухолевых стволовых клеток [11].

Целью данной работы являлось исследование влияния АраЦ при противоопухолевом действии ПИ в дозе 10 Гр на рост солидной формы асцитной карциномы Эрлиха при обработке клеток в условиях *ex vivo* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и опухолевая модель. Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах мышей колонии SHK (31–35 г), полученных из питомника животных «Столбовая» НЦ ФМБА, которых содержали и разводили в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино, Россия) [12]. Мыши содержались в полипропиленовых клетках по 10 особей. Протокол эксперимента (№ 6 от 18.03.2024) был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике, и все процедуры проводились в соответствии с законами и правилами, касающимися испытаний на животных и гуманного обращения с ними. В качестве модели опухолевого роста использовалась солидная форма асцитной карциномы Эрлиха. Данная модель является хорошо изученной и широко используется в неклинических и доклинических исследованиях канцерогенеза и противоопухолевой эффективности химических и физических факторов [13]. Выбор модели АКЭ был обусловлен тем, что опухоль может расти в асцитной и солидной форме, динамика роста слабо зависит от линии мышей, асцитные клетки можно имплантировать в разные локализации несколькими способами (внутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно, внутривенно и в легкие). Линия опухолевых клеток получена в ФГБУН «РНЦ им. Н. Н. Блохина» (Москва). Клетки АКЭ поддерживали *in vivo* в форме асцита у мышей SHK путем серийной внутрибрюшинной инокуляции с интервалом 7–9 сут. У животных в асептических условиях извлекали асцитную жидкость и трижды промывали фосфатно-солевым буфером с помощью центрифугирования при 500 об./мин в течение 5 мин. Затем с помощью красителя трипановый синий в камере Горяева оценивали жизнеспособность клеток АКЭ, которая составляла не менее 98%.

Животные были разделены на 4 группы: «контроль», «контроль + АраЦ», «10 Гр» и «АраЦ + 10 Гр», в каждой из которых было не менее 10 мышей. Проведено два независимых эксперимента.

Условия обработки АраЦ и ПИ суспензии клеток АКЭ в условиях *ex vivo*.

За 1 ч до облучения в эппендорф с $20 \cdot 10^6$ клеток/мл добавляли раствор АраЦ таким образом, чтобы в конечной концентрации было 125 мг/кг. Клетки содержались в присутствии АраЦ при комнатной температуре приблизительно 2 ч, включая 1 ч до облучения, время облучения, транспортировку к источникам и время до имплантации мышам. Концентрация, растворитель и способ введения АраЦ были выбраны на основе предыдущих работ по изучению влияния разных концентраций и способов введения вещества на выживаемость мышей линии С57В1/6 и противоопухолевые эффекты при сочетанном действии ПИ и АраЦ на клетки меланомы *in vivo* [14, 11].

Источником ПИ служил синхротрон комплекса ПТ «Прометеус» ЦКП ФТЦ ФИАН (Протвино). При облучении эппендорф 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. Объем мишени ($V = (29,2 \pm 0,1) \text{ см}^3$) был выбран в форме параллелепипеда с захватом окружающего пространства для гарантированного равномерного облучения всей суспензии клеток. Облучение планировалось с одного направления методом сканирования по всему объему. Суспензию клеток облучали дозой 10 Гр в модифицированном пике Брэгга с энергией протонов на выходе с ускорителя 111–123 МэВ. Поглощенная доза контролировалась с помощью дозиметра РТW Unidos weblines с ионизационной камерой (РТW PinPoint 3D-Chamber 31022). На уровне 95 % изодозы однородность дозы составляла не менее 97 %. Точность определения дозы в зоне облучения была 3 %.

После облучения асцитных клеток мышам внутримышечно вводили $2 \cdot 10^6$ клеток в бедро лапы. Мышам контрольной группы инокулировали такое же количество необлученных клеток АКЭ, суспензия которых подвергалась тем же условиям хранения, транспортировки и имитации облучения.

Условия обработки АраЦ и ПИ клеток солидной АКЭ в условиях *in vivo*. Для индукции *in vivo* солидной АКЭ мышам внутримышечно вводили $2 \cdot 10^6$ клеток в бедро левой задней лапы. Облучение протонами в дозе 10 Гр проводили на пятые сутки после инокуляции АКЭ при пальпации опухолевого узла у всех животных. За 1 ч до локального облучения опухоли мышам внутрибрюшинно вводили АраЦ, разведенный 0,9 % NaCl, в конечной концентрации 125 мг/кг. Концентрация соответствует терапевтической дозе АраЦ, используемой при лечении лейкозов высокими дозами препарата у человека [15].

Для иммобилизации мышей во время локального облучения опухолей использовали кратковременную анестезию с помощью внутрибрюшинного введения анестезирующей смеси золетила (0,7 мг/кг) и ксилазина (3,4 мг/кг). Состав и концентрации анестезии были подобраны нами в предварительных экспериментах и обеспечивали полное обездвиживание животных во время облучения и 100%-й выход мышей из анестезии без гибели и применения средств-антагонистов [16]. Контрольная группа включала необлученных мышей с опухолями, подвергавшихся транспортировке к источнику излучения, анестезии и имитации условий облучения.

Облучение протонами планировали с одного направления методом сканирования по всему объему. При облучении мышь фиксировали пластиковыми зажимами на платформе из полипропилена таким образом, чтобы облучаемая конечность была максимально удалена от тела, затем платформу наклонно погружали в водный фантом и получали томограмму опухоли. При составлении плана облучения использовали средний фактический объем опухоли, который равнялся $(0,47 \pm 0,05) \text{ см}^3$. Данный объем был выбран на основе наших предыдущих экспериментов, где была показана более высокая противоопухолевая эффективность и значительное увеличение средней продолжительности жизни мышей при облучении протонами фактического объема опухоли по сравнению с облучением большего, так называемого планируемого объема [17]. Верификацию положения каждой мыши при облучении проводили с помощью лазерной системы позиционирования и съемки проекций с совмещением текущего положения мишени с исходным с точностью 1 мм. Облучение заданного объема проходило с одного направления тонким пучком протонов, энергия протонов на выходе составляла 95–104 МэВ, сигма пучка на входе в водный фантом составляла 2,8–3,6 мм. Облучение проходило в импульсном режиме с длительностью импульса 200 мс и цикличностью 1 импульс в 2 с.

Регистрация противоопухолевых показателей. После облучения у мышей ежедневно наблюдали за частотой индукции солидных опухолей, динамикой и скоростью их роста в течение 35 сут. Опухоль считали индуцированной при достижении объема не менее $0,40 \text{ см}^3$. Трижды в неделю с помощью штангенциркуля у каждой мыши измеряли три ортогональных диаметра опухоли и величину опухоли (в см^3), рассчитывали по стандартной формуле: объем опухоли = $\pi/6 d_1 d_2 d_3$, где d_1 – d_3 — три ортогональных диаметра.

На основе полученных измерений оценивали несколько показателей развития новообразования. Величину торможения роста опухоли (ТРО) высчитывали по формуле $\text{ТРО} (\%) = (V_{\text{кон}} - V_{\text{экс}}) / V_{\text{кон}} \cdot 100 \%$, где V — объем опухоли в см^3 . Клинически значимый уровень определяли при значении $\text{ТРО} > 50 \%$.

Индекс роста опухоли (ИРО) определяли по формуле $\text{ИРО} = S_{\text{экс}} / S_{\text{кон}} \cdot 100 \%$, где $S_{\text{экс}}$ — площадь под кинетической кривой роста опухоли в группе облученных животных, а $S_{\text{кон}}$ — площадь под кинетической кривой роста опухоли контрольной группы.

Для измерения площади под кинетической кривой роста опухоли использовали метод трапеций, базирующийся на формуле

$$S = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{V_i + V_{i+1}}{2} t_i = \frac{V_1 + V_2}{2} t_1 + \frac{V_2 + V_3}{2} t_2 + \dots + \frac{V_{n-1} + V_n}{2} t_{n-1},$$

где V_i — объем опухоли в соответствующем измерении под номером i ; n — число измерений; время (сут): t_1 — между первым и вторым измерениями, t_2 — между вторым и третьим измерениями, t_{n-1} — между предпоследним и последним измерениями. Конечную точку для расчета площади брали на 35-е сутки со дня имплантации опухоли. ИРО является интегральным показателем противоопухолевой активности с учетом не только выраженности противоопухолевого эффекта, но и его устойчивости. Считается, что чем меньше значение ИРО, тем значительнее терапевтическое действие исследуемого воздействия.

Скорость роста опухоли рассчитывали по среднему времени пятикратного увеличения опухоли, которое рассчитывалось как среднее количество дней от начала роста опухоли до объема опухоли, достигающего увеличения в пять раз. Увеличение продолжительности жизни (УПЖ) рассчитывали по формуле $УПЖ = (СПЖ_{\text{экс}} - СПЖ_{\text{кон}}) / СПЖ_{\text{кон}} \cdot 100 \%$. Клинически значимый уровень считали при значении $УПЖ > 25 \%$.

Статистическая обработка. Результаты исследования подвергали статистическому анализу с расчетом среднего значения и среднеквадратичной погрешности. Статистическую оценку различий между группами, имеющими нормальное распределение, проводили с помощью t-критерия Стьюдента; в остальных случаях использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения результатов эксперимента, где показатели выражались в долях, достоверность различий оценивали по критерию углового преобразования Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прививаемость опухолей оценивали по количеству мышей с опухолями. В контрольной группе у 100% мышей индуцировались солидные опухоли, которые на 5-е сутки после имплантации необлученных клеток достигали объема не менее $0,4 \text{ см}^3$, и через 35 сут стандартного для этой модели опухолевого роста объема — около 8 см^3 . В группах, обработанных АраЦ без облучения, как *ex vivo*, так и *in vivo*, появление опухолей по времени и частоте не отличалось от необработанного контроля. Предобработка клеток АраЦ в условиях *ex vivo* не влияла на процессы, обуславливающие после внутримышечной имплантации прикрепление, деление клеток АКЭ и формирование солидной опухоли у необлученных животных, поскольку не было задержки времени появления опухолей и их первичный размер был такой же, как и в группе без АраЦ, т. е. не было обнаружено влияния на туморогенность клеток АКЭ в условиях аппликации клеток при комнатной температуре в течение 1 ч в высокой концентрации АраЦ. В работе [18] на культурах опухолевых клеток HeLa показано, что в условиях *in vitro* эффект АраЦ напрямую зависел от дозы и времени инкубации. Авторы [19] показали, что адгезивные клетки фибросаркомы и меланомы человека демонстрировали значительные уровни апоптоза в ответ на воздействие АраЦ, а клетки, выдержанные в суспензии в течение 2 ч, показали минимальную гибель клеток. Таким образом, потеря нормальной адгезии в восприимчивых опухолевых клетках во время генотоксического стресса может играть роль в резистентности к терапии и способствовать выживанию клеток. Можно предположить, что при нашей постановке эксперимента при помещении клеток в условия организма, в гипоксическом микроокружении формирования солидной опухоли происходит стимулирование деления клеток до достаточного количества, чтобы преодолеть иммунитет мышей, и использование модификаторов позволяет оценить воздействие на эти этапы.

На рис. 1 представлены результаты по регистрации частоты индукции опухолей у мышей после инокуляции облученных асцитных клеток и облучения солидных опухолей АКЭ в течение месяца.

Как видно из рис. 1, после облучения клеток *ex vivo* протонами в дозе 10 Гр в группе мышей, предварительно обработанных АраЦ, на 5-е сутки не наблюдали индукции опухолей, а на 10-е сутки опухолевые узлы пальпировались только у 22%

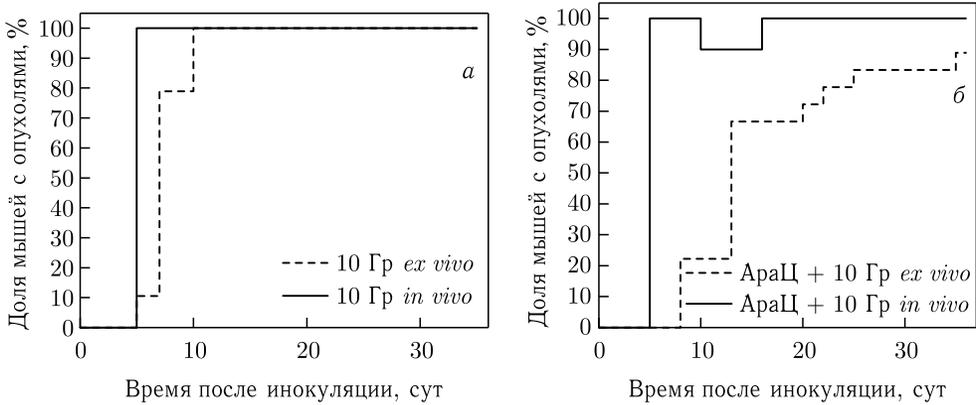


Рис. 1. Динамика появления опухолей в течение месяца после: а) облучения протонами в дозе 10 Гр АКЭ *in vivo* и *ex vivo*; б) обработки АраЦ за 1 ч до облучения протонами в дозе 10 Гр

мышей. При наблюдении до 35 сут после облучения в группе мышей «АраЦ + 10 Гр» на 15-е и 20-е сутки количество мышей с опухолями росло и достигало к концу срока наблюдения 80% в отличие от 100% в группе «10 Гр», т. е. при сочетанном действии протонов и АраЦ наблюдается снижение туморогенности опухоли. После облучения солидной АКЭ *in vivo* протонами в группе мышей, предварительно обработанных АраЦ, на 5-е и 10-е сутки наблюдали рассасывание первичного опухолевого узла у 10% мышей, а к 15-м суткам рост опухоли возобновился.

На рис. 2 показана динамика роста опухолей после облучения протонами в комбинации с АраЦ в условиях *ex vivo* и *in vivo*. Поскольку в группе мышей после имплантации клеток, облученных *ex vivo*, опухоли появляются на 5-е сутки после облучения и, соответственно, происходит задержка на 5 сут на протяжении всего

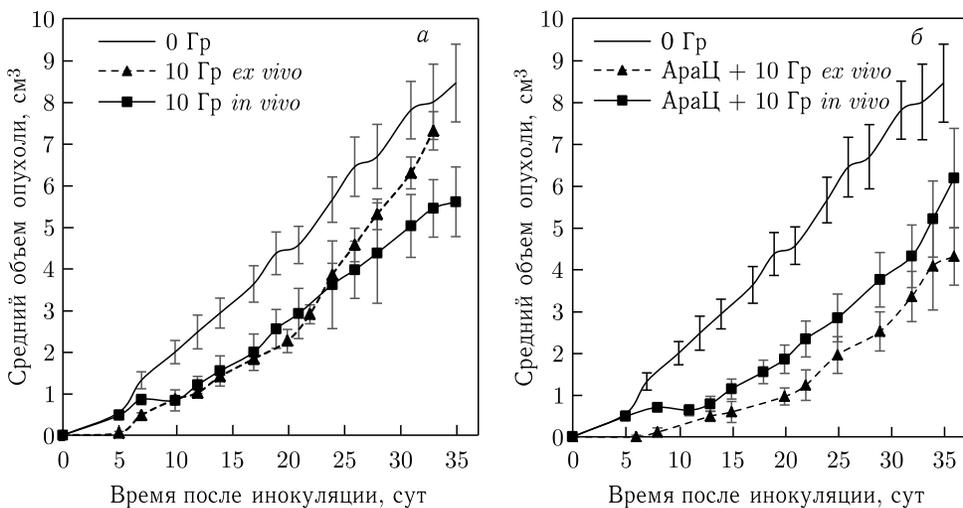


Рис. 2. Динамика роста солидной АКЭ после имплантации облученных клеток протонами в дозе 10 Гр (а) и комбинарованным воздействием с АраЦ (б)

периода роста опухолей, для того чтобы уравнивать точку 0, мы нормализовали кривые к моменту имплантации. При действии только ПИ закономерности роста опухолей были одинаковыми, т. е. разные условия облучения асцитных клеток в суспензии при выровненных нормоксических условиях или в составе солидной опухоли в гипоксическом окружении не влияли на пролиферацию и гибель клеток (рис. 2, а). Это наблюдение иллюстрирует ограничение модификации повреждений, индуцированных ПИ, изменением содержания кислорода при облучении и концентрацией обработанных клеток.

При сочетанном действии АраЦ и ПИ достоверные различия роста опухолей от условий облучения наблюдались в первые 20 сут, далее средний объем опухолей в группах *ex vivo* и *in vivo* не отличался (рис. 2, б).

Кривые роста опухолей после облучения ПИ *ex vivo* и *in vivo* или в присутствии АраЦ показывают, что разные условия облучения или инкубации незначительно влияют на процессы роста опухоли как при облучении уже сформировавшегося опухолевого узла, так и при имплантации обработанных клеток здоровым мышам, что позволяет сравнивать результаты, полученные при разных условиях.

У всех мышей с опухолями, индуцированными за все время наблюдения, измеряли скорость роста опухолей. У мышей контрольных групп *ex vivo* и *in vivo* скорость роста опухолей была одинаковой, что позволило нам суммировать данные. На рис. 3 представлено время роста опухолей у мышей, которое определялось как время, необходимое для 5-кратного увеличения исходного объема после облучения опухолевых клеток *ex vivo* и *in vivo* протонами и их комбинацией с АраЦ. Среднее время пятикратного увеличения объема опухоли у контрольной группы составило

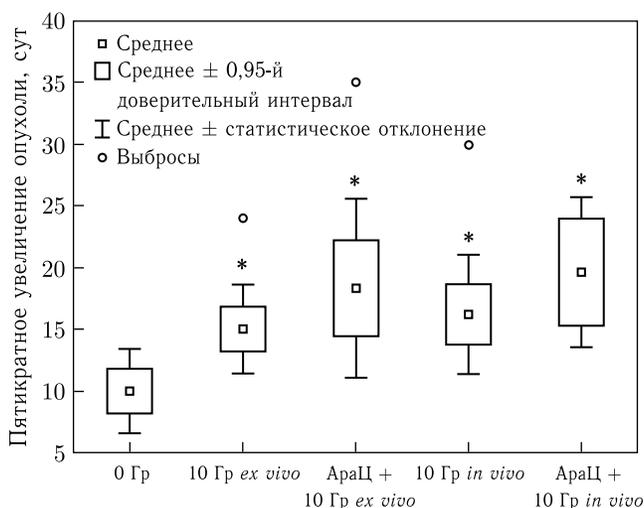


Рис. 3. Время роста опухолей у мышей после имплантации асцитных клеток, облученных *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозе 10 Гр и при комбинированном воздействии с АраЦ. Данные представлены в количестве суток, необходимом для увеличения объема опухоли в пять раз по сравнению с первым измеренным объемом. Объемы нормализованы к первому измеренному объему $\geq 0,40 \text{ см}^3$. Статистическая значимость от контрольной группы оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни (* — $p \leq 0,05$)

($10,0 \pm 3,3$) сут, в группах, которым имплантировали клетки, облученных 10 Гр *ex vivo*, — ($15,1 \pm 4,2$) сут и «АраЦ + 10 Гр» *ex vivo* — ($18,3 \pm 6,1$) сут, а при облучении солидной АКЭ *in vivo* «10 Гр» — ($16,2 \pm 4,5$) сут и «АраЦ + 10 Гр» — ($19,6 \pm 6,1$) сут. Во всех экспериментальных группах наблюдали достоверное увеличение этого показателя относительно необлученного контроля, однако достоверных различий между обработанными группами обнаружено не было.

Далее рассчитывали время задержки роста опухоли как разницу между средним временем роста опухоли экспериментальной группы и необлученного контроля [20]. Для групп, облученных только ПИ, задержка роста опухоли составила 5–6 сут, а в присутствии АраЦ этот показатель увеличился до 8–10 сут независимо от условий обработки АраЦ и облучения, т. е. *ex vivo* и *in vivo* был выявлен модифицирующий противоопухолевый эффект на величину латентного периода возобновления роста новообразований.

На основе полученных данных были вычислены показатели противоопухолевой эффективности относительно необработанного контроля: ТРО, ИРО и УПЖ, которые позволяют дифференцированно оценить влияние протонов и их комбинированного воздействия с АраЦ на различные этапы развития опухолей. На рис. 4 показана зависимость величины ТРО от времени после облучения клеток АКЭ *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозе 10 Гр и в комбинации с АраЦ относительно необлученного контроля.

Клинически значимый эффект (ТРО > 50 %) на протяжении всего периода наблюдения с 5-х по 35-е сутки после облучения был выявлен только в группе «АраЦ + 10 Гр» при обработке клеток *ex vivo*, а в группе, облученной только 10 Гр *ex vivo*, значительное клинически значимое торможение роста опухоли наблюдали с 5-х по 15-е сутки, затем эффект снижался. Можно предположить, что в этих условиях прямого влияния АраЦ реализация разрывов ДНК за счет ингибирования репарации в летальные для клетки повреждения происходит с одинаковой скоростью и объемом на разных стадиях развития солидной опухоли. Известно, что в зависимости от времени имплантации и стрессовых воздействий на опухоли вклад различных механизмов

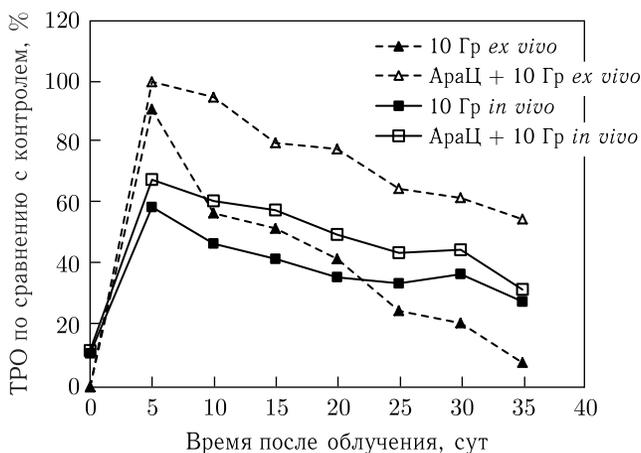


Рис. 4. Зависимость величины ТРО от времени после облучения *ex vivo* и *in vivo* клеток АКЭ протонами в дозе 10 Гр и в комбинации с АраЦ относительно необлученного контроля

гибели как опухолевых клеток, так и нормальных клеток стромы опухоли изменяется. На первых циклах клеточного деления реализация потенциально летальных повреждений ДНК происходит за счет одних механизмов, а в более поздние сроки развития опухоли, вероятно, происходит развитие сигнальных каскадов, приводящих к повышенной гибели клеток. При облучении солидных АКЭ *in vivo* ТРО > 50 % наблюдали в группе «10 Гр» только в течение первых 5 сут после облучения в период постлучевой задержки возобновления роста опухоли, а в группе «АраЦ + 10 Гр» этот эффект сохранялся с 5-х по 20-е сутки после облучения. Выявленные различия в закономерностях модификации демонстрируют, что при облучении суспензии клеток, обработанных АраЦ, сенсibiliзирующий эффект проявляется стабильно и в наибольшей выраженности по сравнению с динамикой индукции и роста облученных солидных опухолей, что может быть обусловлено как разной формой одной и той же опухоли (асцитная и солидная), так и разными условиями инкубации с веществом. Важно отметить, что при действии только ПИ в разных условиях на клетки АКЭ в зависимости от дозы облучения такие различия менее выражены [21].

В табл. 1 представлены результаты определения индекса роста опухоли (ИРО) и значений увеличения продолжительности жизни (УПЖ) при действии ПИ и в комбинации с АраЦ относительно необлученного контроля.

Таблица 1. Значения ИРО и УПЖ при действии ПИ и комбинированном воздействии с АраЦ относительно необлученного контроля

| Воздействие | ИРО, % | | УПЖ, % | |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | <i>ex vivo</i> | <i>in vivo</i> | <i>ex vivo</i> | <i>in vivo</i> |
| 10 Гр | 61* | 58* | 72* | 32* |
| АраЦ + 10 Гр | 34* | 47* | 109,7* | 56* |

* $p \leq 0,05$ по сравнению с необработанным контролем.

В группах, облученных 10 Гр как *ex vivo*, так и *in vivo*, наблюдались близкие значения ИРО, которые были ниже значений необлученного контроля на 39 и 42 %. При предобработке АраЦ опухолевых клеток значение ИРО снижалось как при прямом облучении суспензии клеток, так и локальном опухоли, что свидетельствует об увеличении стабильности терапевтического эффекта облучения в условиях влияния АраЦ, но в группе, обработанной *ex vivo*, он более выражен. При обработке клеток АКЭ *ex vivo* увеличивалась продолжительность жизни мышей на 72 %, а в группе *in vivo* на 32 %, т.е. за счет усиления с помощью АраЦ противоопухолевого действия протонов наблюдали увеличение продолжительности жизни животных более чем в 2 раза относительно контроля.

Далее мы определяли влияние АраЦ в комбинации с ПИ относительно только ПИ. На рис. 5 видно, что АраЦ усиливает действие ПИ в условиях *ex vivo* в большей степени, чем в *in vivo*.

Достоверные различия в динамике роста опухолей в группе комбинированного воздействия АраЦ и ПИ от группы только ПИ в условиях обработки *ex vivo* были, начиная с 5 сут после облучения, и на протяжении всего времени наблюдения, а в группе *in vivo* различия были только в течение 6–8 сут после облучения. Время задержки роста опухоли не отличалось от условий обработки АраЦ и облучения, для

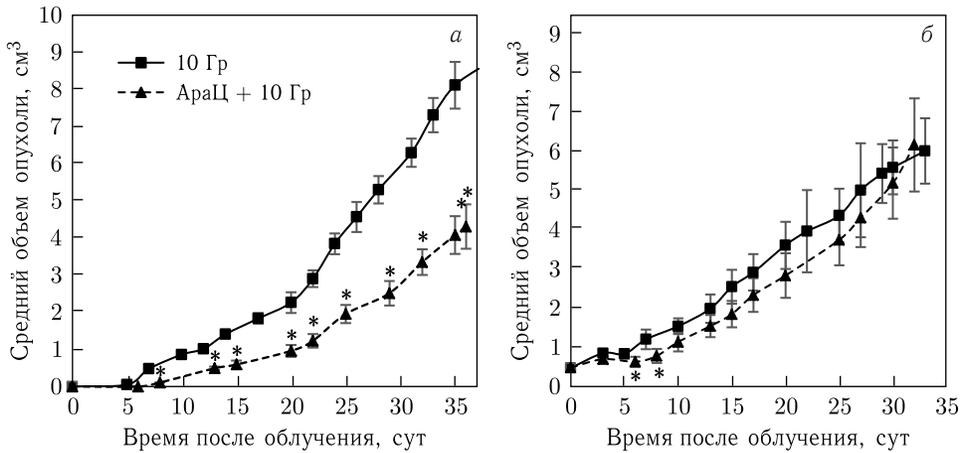


Рис. 5. Динамика роста солидной АКЭ после имплантации облученных клеток *ex vivo* (а) и *in vivo* (б) ПИ в дозе 10 Гр и при комбинированном воздействии с АраЦ. * — $p \leq 0,05$ по сравнению с 10 Гр протонов

ex vivo составило ~ 3 сут, а для *in vivo* ~ 2 сут, т. е. влияния разных концентраций и способов введения АраЦ на этот показатель не выявлено.

На рис. 6 показана динамика изменения величины ТРО от времени после облучения *ex vivo* и *in vivo* клеток АКЭ в комбинации с АраЦ относительно ПИ.

Клинически значимый эффект ТРО при обработке АраЦ наблюдали на протяжении всего времени роста опухоли только в группе, облученной 10 Гр *ex vivo*, это показывает, что в отдаленные сроки после имплантации облученных клеток в условиях влияния АраЦ эффекты обусловлены именно за счет усиления АраЦ радиационного повреждения. При введении АраЦ до облучения солидной опухоли *in vivo* значения ТРО с 5-х по 15-е сутки составляли 25–27%, что является статистически

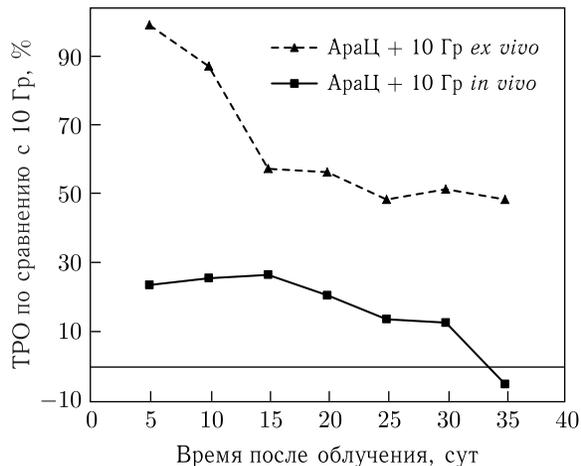


Рис. 6. Зависимость величины ТРО от времени после облучения *ex vivo* и *in vivo* клеток АКЭ протонами в дозе 10 Гр и в комбинации с АраЦ

Таблица 2. Влияние комбинированного воздействия с АраЦ и ПИ на продолжительность жизни мышей-опухоленосителей

| Группа | СПЖ, сут | | УПЖ, % | |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | <i>ex vivo</i> | <i>in vivo</i> | <i>ex vivo</i> | <i>in vivo</i> |
| 10 Гр | 40,6 ± 1,5 | 31,2 ± 3,8 | — | — |
| АраЦ + 10 Гр | 49,5 ± 6,2 | 36,8 ± 8,2 | 22 | 18 |

значимыми различиями между группами, но меньше клинически значимых значений. По-видимому, при облучении опухоли *in vivo* усиление с помощью АраЦ клеточной гибели происходит только в экспоненциальной фазе развития опухоли.

ИРО при прямой обработке АраЦ и дальнейшем облучении протонами в дозе 10 Гр *ex vivo* относительно группы, облученной только протонами, равнялся 56 %, что свидетельствует об усилении модифицирующего эффекта почти в 2 раза при применении АраЦ перед облучением. В группах, облученных *in vivo*, ИРО равнялся 81 %, т. е. объем опухоли в присутствии АраЦ уменьшался в 1,2 раза по сравнению с группой, облученной только протонами. Эти различия были статистически достоверными и свидетельствуют о синергетическом эффекте АраЦ, но величина показателя с точки зрения клинических требований не достаточна.

Более низкая частота индукции опухолей у мышей и значительное торможение скорости роста опухолей в обработанных группах привело к увеличению СПЖ, которое рассчитывалось как время, в течение которого размер опухоли достигал 10 см³ (в этот момент мыши выводились из эксперимента эвтаназией с помощью хлороформа). Из результатов табл. 2 видно, что СПЖ в группах при облучении клеток АКЭ в условиях как *ex vivo*, так и *in vivo* при комбинированном воздействии с АраЦ была выше, но величина коэффициента УПЖ не являлась клинически значимой (< 50 %) относительно группы, подвергшейся только облучению протонами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было выявлено усиление противоопухолевого действия ПИ в условиях влияния АраЦ как при облучении *ex vivo*, так и *in vivo* по всем исследуемым показателям. Радиосенсибилизирующее действие АраЦ при облучении *ex vivo* было более выражено, что является интересным для дальнейшего обсуждения и изучения с точки зрения реализации механизмов действия АраЦ на разных этапах канцерогенеза в зависимости от способов введения, температуры, времени инкубирования и облучения, подбора эффективных концентраций [22], участия кислородных условий и микроокружения опухоли при облучении *ex vivo* и *in vivo*.

После имплантации мышам суспензии *ex vivo* облученных асцитных клеток следующие процессы, влияющие на судьбу разных по радиочувствительности клеток, происходили в условиях организма со всеми факторами гибели опухолевых клеток, индуцированных воспалительных реакций организма, гипоксических условий в области роста опухоли, что является, на наш взгляд, полезной экспериментальной моделью для исследования условий микроокружения, влияющих на индукцию и развитие новообразований. Модель солидной формы АКЭ на мышах относится к агрессивному быстрорастущему типу опухоли со 100%-й гибелью животных с появившимися

опухольями в течение 35–40 сут. Поскольку мы использовали однократную дозу ПИ, равную по величине примерно полудетальной для опухолевых клеток, установленной в экспериментах *in vitro* по клеточной выживаемости, то выявленные закономерности действия АраЦ свидетельствуют о его влиянии на гибель клеток на всех этапах развития опухолей, однако уточнение молекулярных механизмов усиления действия протонов требует дальнейшего изучения.

Использование облучения и обработки АраЦ опухолевых клеток вне организма с последующей имплантацией для индукции роста солидной опухоли на этапе поиска оптимальных условий для ПТ и исследования механизмов модифицирующего действия АраЦ на противоопухолевые процессы продемонстрировало возможности для дальнейшего развития биомедицинской модели [23] и наметило пути раскрытия потенциала АраЦ. Остается актуальной проблема подбора эффективных концентраций и режимов введения при переходе с условий *in vitro* на культивируемых опухолевых клетках, где показаны механизмы реализации действия АраЦ в широком диапазоне доз, на условия *ex vivo* и в дальнейшем *in vivo*, которые необходимо учитывать для эффективной реализации специфических механизмов действия АраЦ, и, возможно, участия других молекулярных механизмов, зависящих от концентрации вещества, его фармакокинетики, способа и режима введения, а также типа опухоли. Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на роль уже известных путей модификации потенциальных повреждений ДНК, которые по-разному реализуются на определенных стадиях онкогенеза и рецидивирования опухолей, связанных с гибелью разных популяций клеток или стимулированием их деления в условиях гипоксического микроокружения опухоли.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность руководителю Центра коллективного пользования ФТЦ ФИАН А. Е. Шемякову за помощь в проведении облучения на комплексе протонной терапии «Прометеус» и дозиметрическое сопровождение экспериментов.

Финансирование. Исследования выполнены при финансовой поддержке из средств договора НИР № 090-02198 с Объединенным институтом ядерных исследований (Дубна) и в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00224-24-03.

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 № 6 от 18.03.2024).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paganetti H., Beltran C., Both S., Dong L., Flanz J., Furutani K., Lomax T. Roadmap: Proton Therapy Physics and Biology // *Phys. Med. Biol.* 2021. V. 66, No. 5. P. 05RM01.
2. Deysmar S., Faccin E., Kazimova T., Knobel P.A., Telarovic I., Tschanz F., Waller V., Winkler R., Yong C., Zingariello D., Pruschy M. The Relative Biological Effectiveness of

- Proton Irradiation in Dependence of DNA Damage Repair // *Br. J. Radiol.* 2020. V.93, No. 1107.
3. Балакин В. Е., Белякова Т. А., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Шемяков А. Е., Стрельникова Н. С. Использование модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей для исследования ранних и отдаленных последствий гипофракционированного протонного облучения // *Биомедицина.* 2021. Т. 17, № 3Е. С. 127–132.
 4. Балакин В. Е., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Белякова Т. А., Шемяков А. Е., Стрельникова Н. С. Комбинированное действие нейтронного и протонного излучений на рост солидной формы асцитной карциномы Эрлиха и отдаленные последствия у мышей // *ДАН. Науки о жизни.* 2021. Т. 498. С. 5–11.
 5. Santos A., Penfold S., Gorayski P., Le H. The Role of Hypofractionation in Proton Therapy // *Cancers (Basel).* 2022. V. 14, No. 9.
 6. Wang H., Mu X., He H., Zhang X. D. Cancer Radiosensitizers // *Trends Pharmacol. Sci.* 2018. V. 39, No. 1. P. 24–48.
 7. Газиев А. И. О перспективах использования ингибиторов репарации ДНК в радиотерапии опухолей // *Рад. биология, радиозоология.* 2014. Т. 54, № 3. С. 229–240.
 8. Momparler R. L. Optimization of Cytarabine (ARA-C) Therapy for Acute Myeloid Leukemia // *Exp. Hematol. Oncol.* 2013. V. 2, No. 20.
 9. Борейко А. В., Чаусов В. Н., Красавин Е. А., Равчанка И., Стукова С. И. Влияние ингибиторов синтеза ДНК на индукцию и репарацию двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии излучений с разной ЛПЭ // *Письма в ЭЧАЯ.* 2011. Т. 8, № 4(167). С. 670–678.
 10. Чаусов В. Н., Борейко А. В., Буланова Т. С., Заднепрянец М. Г., Ильина Е. В., Йежкова Л., Красавин Е. А., Кожина Р. А., Кузьмина Е. А., Куликова Е. А., Смирнова Е. В., Тиунчик С. И. Формирование прямых и энзиматических двунитевых разрывов ДНК в условиях влияния ингибиторов репарации при действии излучений разного качества // *Письма в ЭЧАЯ.* 2018. Т. 15, № 6(218). С. 573–588.
 11. Zamulaeva I. A., Motchuk O. N., Selivanova E. I., Yakimova A. O., Mosina V. A., Koryakin S. N., Kaprin A. D., Boreyko A. V., Bugay A. N., Chausov V. N., Krasavin E. A. Radiobiological Effects of the Combined Action of 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine and Proton Radiation on B16 Melanoma *in vivo* // *Phys. Part. Nucl. Lett.* 2023. V. 20, No. 1.
 12. Smith J. A., van den Broek F. A., Martorell J. C., Hackbarth H., Ruksenas O., Zeller W. 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, No. 2. P. 143–160.
 13. Mishra S., Tamta A. K., Sarikhani M., Desingu P. A., Kizkekra S. M., Pandit A. S., Kumar S., Khan D., Raghavan S. C., Sundaresan N. R. Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma Mice Model for Studying Cancer-Induced Cardiomyopathy // *Sci. Rep.* 2018. V. 8, No. 1. P. 5599.
 14. Борейко А. В., Заднепрянец М. Г., Чаусов В. Н., Храшко Т. С., Кожина Р. А., Кузьмина Е. А., Тиунчик С. И., Красавин Е. А. Комбинированное действие ингибиторов синтеза ДНК и ускоренных протонов на клетки злокачественных опухолей // *Письма в ЭЧАЯ.* 2023. Т. 20, № 4(249). С. 698–708.
 15. Di Francia R., Crisci S., De Monaco A., Cafiero C., Re A., Iaccarino G., De Filippi R., Frigeri F., Corazzelli G., Micera A., Pinto A. Response and Toxicity to Cytarabine Therapy in Leukemia and Lymphoma: From Dose Puzzle to Pharmacogenomic Biomarkers // *Cancers.* 2021. V. 13, No. 5. P. 966.
 16. Балакин В. Е., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Белякова Т. А., Стрельникова Н. С. Влияние ксилазин-золетиловой анестезии на радиочувствительность мышей при тотальном об-

- лучении рентгеновским излучением, протонами и ионами углерода // ДАН. Науки о жизни. 2022. Т. 506, № 1. С. 343–348.
17. Балакин В. Е., Шемяков А. Е., Заичкина С. И., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Романченко С. П., Сорокина С. С., Стрельникова Н. С. Гипофракционированное облучение солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей тонким сканирующим пучком протонов // Биофизика. 2016. Т. 61, № 4. С. 808–812.
 18. Lengsfeld A. M., Maurer-Schultze B. The Effect of ara-C on Survival and Proliferation of HeLa Cells. A Time-Lapse Cinematographic and Light Microscopic Study // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1986. V. 111, No. 3. P. 220–228.
 19. Lewis J. M., Truong T. N., Schwartz M. A. Integrins Regulate the Apoptotic Response to DNA Damage through Modulation of p53 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99, No. 6. P. 3627–3632.
 20. Ando K., Koike S., Uzawa A., Takai N., Fukawa T., Furusawa Y., Aoki M., Miyato Y. Biological Gain of Carbon-Ion Radiotherapy for the Early Response of Tumor Growth Delay and Against Early Response of Skin Reaction in Mice // J. Radiat. Res. 2005. V. 46, No. 1. P. 51–57.
 21. Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Белякова Т. А., Стрельникова Н. С., Смирнов А. В. Закономерности индукции и роста опухолей у мышей при облучении тонким сканирующим пучком протонов клеток карциномы Эрлиха *ex vivo* и *in vivo* // Биофизика. 2024. Т. 69, № 1. С. 183–192.
 22. Шекунова Е. В., Ковалева М. А., Макарова М. Н., Макаров В. Г. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз // Ведомости Науч. центра экспертизы средств мед. применения. 2020. Т. 10, № 1. С. 19–28.
 23. Стрельникова Н. С., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Белякова Т. А., Смирнов А. В. Изучение эффективности высоких доз протонов на индукцию солидных опухолей у мышей при облучении асцитных клеток карциномы Эрлиха *ex vivo* // Биомедицина. 2023. Т. 19, № 3Е. С. 66–70.

Получено 10 октября 2024 г.