

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЫСОКИХ ДОЗ ПРОТОНОВ НА ИНДУКЦИЮ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ У МЫШЕЙ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ АСЦИТНЫХ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА *EX VIVO*

Н.С. Стрельникова^{1,*}, О.М. Розанова², Е.Н. Смирнова²,
Т.А. Белякова¹, А.В. Смирнов¹

¹ Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН «Физический институт им. П.Н. Лебедева»
РАН142281, Российская Федерация, Московская обл., Протвино, Академический пр., 2

² ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 3

Изучены закономерности индукции солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей в короткие (1 мес.) и отдаленные (18 мес.) сроки после инокуляции асцитных клеток, облученных *ex vivo* пучком протонов дозами 30, 60, 90, 120 и 150 Гр. 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 была дозозависимой и уменьшалась с 80 до 0% с ростом дозы. Таким образом, использование модели облучения опухолевых клеток *ex vivo* с последующей перевивкой *in vivo* позволило нам определить параметры противоопухолевого действия новых схем протонной терапии.

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

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

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.

Для цитирования: 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;19(3E):66–70. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-66-70>

Поступила 10.04.2023

Принята после доработки 14.04.2023

Опубликована 06.11.2023

EFFICACY OF HIGH DOSES OF PROTONS ON THE INDUCTION OF SOLID TUMORS IN MICE BY *EX VIVO* IRRADIATION OF EHRlich ASCITIC CARCINOMA CELLS

Nataliia S. Strelnikova^{1,*}, Olga M. Rozanova², Helena N. Smirnova²,
Tatiana A. Belyakova¹, Aleksandr V. Smirnov¹

¹ Branch "Physical Technical Center", P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences
142281, Russian Federation, Moscow Region, Protvino, Akademicheskij Passage, 2

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya Str., 3

We study the induction patterns of the solid form of Ehrlich ascitic carcinoma (EAC) in mice in the short- (1 month) and long-term (18 months) periods after inoculation of ascitic cells irradiated *ex vivo* with a proton beam at doses of 30, 60, 90, 120, and 150 Gr. 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 transplanted with EAC cells was dose-dependent and decreased from 80% to 0% along with an increase in radiation dose. Thus, using the *ex vivo* model of tumor cell irradiation followed by *in vivo* grafting allowed us to determine the parameters of the antitumor effect of new proton therapy regimens.

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

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the work was carried out within fundamental scientific research on the topic of GZ No. 075-013027-22-00 and at the expense of partial financial support from the funds of the agreement between the PTC LPI RAS and ITEB RAS No. 28/22.

For citation: Strelnikova N.S., Rozanova O.M., Smirnova E.N., Belyakova T.A., Smirnov A.V. Efficacy of High Doses of Protons on the Induction of Solid Tumors in Mice by *Ex vivo* Irradiation of Ehrlich Ascitic Carcinoma Cells. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):66–70. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-66-70>

Submitted 10.04.2023

Revised 14.04.2023

Published 06.11.2023

Введение

Протонная терапия (ПТ) является современным, активно развивающимся методом лучевой терапии. Использование технологии тонкого сканирующего пучка обеспечивает точную выгрузку дозы в опухоли, максимально снижая повреждение окружающих тканей. Ранее нами на модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей была показана возможность однократного облучения протонами в высоких дозах 30–80 Гр, которые не только полностью подавляли рост первичной опухоли, но и снижали частоту ее рецидивирования [1]. В настоящее время критическим компонентом в возникновении, росте, метастазировании и рецидивировании опухолей считают небольшой пул (0,01–4%) опухолевых стволовых клеток (ОСК) [5]. Показано, что ОСК проявляют повышенную устойчивость к химиотерапии и радиотерапии. Из-за сложности идентификации и выделения ОСК существует необходимость разработки новых моделей и подходов с использованием, в частности,

высоких доз протонов, которые, в отличие от фотонных излучений, можно корректно доставлять в мишень, что позволяет исследовать влияние излучения и его модификаций на ОСК.

Целью 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.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на двухмесячных самцах мышей колонии SHK (масса тела 30–34 г), которых содержали в стандартных условиях вивария [3]. Дизайн эксперимента был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике. В качестве модели опухоли была использована асцитная форма АКЭ. Клетки АКЭ поддерживали *in vivo* в форме асцита у мышей SHK путем серийной внутрибрюшинной перевивки. Выделенные опухоле-

вые клетки ресуспендировали в физ. р-ре до концентрации 20×10^6 клеток/мл и помещали в эппендорфы объемом 1,5 мл.

Облучение клеток протонами (~100 МэВ) в модифицированном пике Брэгга проводили методом сканирования по заданному объему в дозах 30–150 Гр на синхротроне комплекса ПТ ФТЦ ФИАН (Протвино). После облучения экспериментальным и контрольным мышам внутримышечно вводили 2×10^6 клеток АКЭ в бедро левой лапы. В каждой группе было 10 мышей. Далее наблюдали за частотой индукции солидных опухолей и скоростью их роста. Размеры опухолей измеряли еженедельно и вычисляли объёмы по стандартной методике [2]. Для статистической оценки значимости различий применяли *t*-критерий Стьюдента и непараметрический *U*-критерий Манна — Уитни. Различия считали статистически не значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В контрольной группе у всех мышей, которым были введены необлученные клетки, индуцировалась солидная опухоль, пальпируемая на 5-е сут (~0,4 см³), через 35 сут она достигала стандартного для этой модели объема ~7,5 см³. В группах мышей, которым были инокулированы облученные клетки, наблюдали появление опухолей у отдельных животных с задержкой

ми начала роста АКЭ, скорость их роста не отличалась от скорости роста опухолей у мышей контрольной группы. Возможно, что 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.

В таблице представлена частота индукции опухолей у мышей после инокуляции облученных клеток АКЭ за время наблюдения до 18 мес. Появление опухолей наблюдалось в первые два месяца, а далее количество опухолей не изменялось до конца жизни экспериментальных животных. 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* однократно в дозах 60 и 80 Гр 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 [1]. Мы предполагаем, что при использовании данной модели после облучения суспензии *ex vivo* в сублетальных и летальных дозах протонов с последующей

Таблица. Частота индукции опухолей у мышей после инокуляции клеток АКЭ, облучённых протонами в дозах 30–150 Гр, в течение всего периода наблюдения

Table. Frequency of tumor induction in mice after inoculation of EAC cells irradiated with protons at doses of 30–150 Gr throughout the observation period

Доза облучения	Количество мышей с опухолями, %									
	1 мес.	2 мес.	3 мес.	4 мес.	5 мес.	6 мес.	7 мес.	8 мес.	~	18 мес.
0 Гр	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-
30 Гр	65	80	80	80	80	80	80	80	~	80
60 Гр	55	60	60	60	60	60	60	60	~	60
90 Гр	25	25	25	25	25	25	25	25	~	25
120 Гр	5	10	10	10	10	10	10	10	~	10
150 Гр	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0

инкубацией в условиях функционирования нормального иммунитета организма происходит гибель дифференцированных опухолевых клеток, 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. 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 [4].

Заключение

Используя в работе однократно экстремально высокие для выживаемости клеток дозы, равные величине суммарной дозы

при 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. 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 разработок доклинических моделей оценки эффективности противоопухолевых воздействий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Балакин В.Е., Белякова Т.А., Розанова О.М. и др. Использование модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей для исследования ранних и отдаленных последствий гипофракционированного протонного облучения. *Биомедицина*. 2021;17(3E):127–132. [Balakin V.E., Belyakova T.A., Rozanova O.M., et al. Ispol'zovanie modeli solidnoj formy ascitnoj karcinomy Erliha u myshej dlya issledovaniya rannih i otdalennyh posledstvij gipofrakcionirovannogo protonnogo oblucheniya [Study of early and remote effects of hypofractionated proton irradiation in a model of solid Ehrlich ascites carcinoma in mice]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(3E):127–132. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-127-132.
2. Розанова О.М., Смирнова Е.Н., Белякова Т.А. и др. Влияние последовательности действия нейтронного и протонного излучений на опухолевый ответ солидной карциномы Эрлиха и реакции кожи у мышей в ранние и отдаленные сроки. *Биофизика*. 2022;67(5):991–1001. [Rozanova O.M., Smirnova E.N., Belyakova T.A., et al. Vliyanie posledovatel'nosti dejstviya nejtronnogo i protonnogo izlucheniya na opuholevyj otvet solidnoj karcinomy Erliha i reakcii kozhi u myshej v rannie i otdalennye sroki [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;67(5):991–1001. (In Russian)]. DOI: 10.31857/S0006302922050180.
3. 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;41(2):143–160. DOI: 10.1258/002367707780378212.
4. Yang L., Shi P., Zhao G., et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1):8. DOI: 10.1038/s41392-020-0110-5.
5. Yin W., Wang J., Jiang L., Kang J. Cancer and stem cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2021;246(16):1791–1801. DOI: 10.1177/15353702211005390.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Стрельникова Наталия Сергеевна*, Филиал
«Физико-технический центр» ФГБУН «Физи-
ческий институт им. П.Н. Лебедева» РАН;
e-mail: strelnikova.ns@lebedev.ru

Nataliia S. Strelnikova*, Branch “Physical
Technical Center”, P.N. Lebedev Physical Institute
of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: strelnikova.ns@lebedev.ru

Розанова Ольга Митрофановна, ФГБУН
«Институт теоретической и экспериментальной
биофизики» РАН;
e-mail: rozanova.iteb@gmail.com

Olga M. Rozanova, Institute of Theoretical and
Experimental Biophysics of the Russian Academy
of Sciences;
e-mail: rozanova.iteb@gmail.com

Смирнова Елена Николаевна, ФГБУН «Инс-
титут теоретической и экспериментальной био-
физики» РАН;
e-mail: smirnova.elena04@gmail.com

Helena N. Smirnova, Institute of Theoretical and
Experimental Biophysics of the Russian Academy
of Sciences;
e-mail: smirnova.elena04@gmail.com

Белякова Татьяна Анатольевна, Филиал
«Физико-технический центр» ФГБУН «Физичес-
кий институт им. П.Н. Лебедева» РАН;
e-mail: belyakovata@lebedev.ru

Tatiana A. Belyakova, Branch “Physical Technical
Center”, P.N. Lebedev Physical Institute of the
Russian Academy of Sciences;
e-mail: belyakovata@lebedev.ru

Смирнов Александр Валентинович, Филиал
«Физико-технический центр» ФГБУН «Физи-
ческий институт им. П.Н. Лебедева» РАН;
e-mail: smirnov_av@inbox.ru

Aleksandr V. Smirnov, Branch “Physical Technical
Center”, P.N. Lebedev Physical Institute of the
Russian Academy of Sciences;
e-mail: smirnov_av@inbox.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author