

## МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ АРАЦ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ПРОТОНАМИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И *EX VIVO* НА РОСТ СОЛИДНОЙ ОПУХОЛИ У МЫШЕЙ

*Т.А. Белякова*<sup>1</sup>, *О.М. Розанова*<sup>1</sup>, *Е.Н. Смирнова*<sup>1</sup>, *Н.С. Стрельникова*<sup>2</sup>, *Е.А. Красавин*<sup>3</sup>,  
*А.В. Борейко*<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

<sup>2</sup> Филиал “Физико-технический центр” Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физического института им. П. Н. Лебедева РАН, Протвино, Россия

<sup>3</sup> Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия  
e-mail: [belyakovatanya@mail.ru](mailto:belyakovatanya@mail.ru)

**Резюме.** Исследовано модифицирующее действие АраЦ при облучении протонами асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) в условиях *in vivo* и *ex vivo* на индукцию и рост инокулированных 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 в процессе развития сформировавшегося новообразования. Также необходимо учитывать влияние условий инкубации, облучения и концентрации АраЦ.

**Ключевые слова:** асцитная карцинома Эрлиха, протоны, *ex vivo*, *in vivo*, 1-β-D-арабинофуранозилцитозин, мыши.

## MODIFYING EFFECT OF ARAC ON THE GROWTH OF THE SOLID TUMOR EHRLICH CARCINOMA IN MICE UNDER *IN VIVO* AND *EX VIVO* PROTON IRRADIATION OF CELLS

*Т.А. Белякова*<sup>1</sup>, *О.М. Розанова*<sup>1</sup>, *Е.Н. Смирнова*<sup>1</sup>, *Н.С. Стрельникова*<sup>2</sup>, *Е.А. Красавин*<sup>3</sup>,  
*А.В. Борейко*<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, Russia

<sup>2</sup> Branch “Physical-Technical Center” of P.N. Lebedev Physical Institute of RAS, Protvino, Russia

<sup>3</sup> Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

e-mail: [belyakovatanya@mail.ru](mailto:belyakovatanya@mail.ru)

**Summary.** The modifying effect of AraC upon irradiation with proton 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.

**Key words:** Ehrlich ascites carcinoma, protons, *ex vivo*, *in vivo*, 1-β-D-arabinofuranosylcytosine, mice

Наиболее перспективным и активно развивающимся методом адронной терапии для лечения различных опухолей является протонная терапия (ПТ). Значение ОБЭ протонов, на основании которого планируются дозы для ПТ в клиниках, равно 1,1 что является относительно низким по сравнению, например, с ионами углерода, но в перспективе ПТ имеет существенное преимущество за счет использования технологии тонкого сканирующего пучка, позволяющей проводить высокоточное облучение в пике Брэгга глубоко локализованных опухолей вблизи критических органов и тканей. Для повышения эффективности ПТ продолжается активный поиск химических

радиосенсибилизаторов, из которых наиболее перспективными являются ингибиторы репарации критических повреждений ДНК [1]. Данные об этом классе соединений, усиливающих действие фотонных и протонных излучений (ПИ), показали, что наиболее перспективным для исследования модификации ПИ является ингибитор репарации ДР ДНК 1-β-D-арабинофуранозилцитозин (АраЦ), поскольку его высокая эффективность за счет увеличения количества летальных ДР ДНК показана на многочисленных опухолевых клеточных моделях при культивировании *in vitro* [2]. Ранее также были получены на модели меланомы у мышей данные о существенном усилении противоопухолевого действия ПИ с помощью АраЦ [3].

Целью данной работы было исследование модифицирующего действия АраЦ на противоопухолевое действие ПИ при облучении клеток асцитной карциномы Эрлиха в условиях *in vivo* и *ex vivo* на мышах.

Эксперименты проводили на 2-месячных самцах мышей колонии SHK (31–35 г), которых разводили и содержали в условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино, Московская обл.). Протокол экспериментов (№ 6 от 18.03.2024) был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биотехнике. В качестве модели опухолевого роста использовалась асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ), линия опухолевых клеток была получена из криобанка ФГБУН ИБК (Пушино, Россия) и поддерживалась путем внутривентрикулярной (в/вр) перевивки мышам.

Для индукции *in vivo* солидной формы АКЭ мышам в бедро внутримышечно вводили  $2 \times 10^6$  асцитных клеток в объеме 0,1 мл. Облучение протонами проводили на 5-е сутки после инокуляции АКЭ при пальпации опухолевого узла у всех мышей. За 1 ч до облучения мышам в/вр вводили АраЦ, разведенный 0,9% NaCl, в концентрации 125 мг/кг. Для облучения *ex vivo* суспензию клеток АКЭ в концентрации  $20 \times 10^6$  клеток/мл (для имплантации 10 мышам) помещали в эппендорфы объемом 1,5 мл. За 1 ч до облучения клеткам при комнатной температуре был добавлен раствор АраЦ в конечной концентрации 125 мг/кг. После облучения суспензии мышам внутримышечно имплантировали в бедро  $2 \times 10^6$  клеток. Концентрация, растворитель и способ введения АраЦ были выбраны на основе предыдущих работ по изучению влияния разных концентраций и способов введения на выживаемость мышей линии C57Bl/6 и противоопухолевые эффекты при сочетанном действии протонов и АраЦ на клетки меланомы [3]. В каждой группе было не менее 10 мышей и проведено не менее двух независимых экспериментов.

Источником ПИ служил синхротрон в ЦКП «Прометеус» ФТЦ ФИАН (Протвино). Облучение опухолей *in vivo* и суспензии клеток *ex vivo* проводили в водном фантоме с одного направления тонким сканирующим пучком в пике Брэгга в дозе 10 Гр, энергия протонов на выходе составляла 95–104 МэВ, сигма пучка на входе в водный фантом – 2,8–3,6 мм. При составлении плана облучения *in vivo* использовали фактический объем опухоли (GTV), равный среднему объему опухолей в группе  $0,47 \pm 0,05$  см<sup>3</sup>. Для облучения *ex vivo* составляли план с облучаемым объемом 29,2 см<sup>3</sup>. На уровне 95% изодозы однородность дозы составляла не менее 97% с точностью определения дозы в зоне облучения 3%.

После облучения ежедневно наблюдали за динамикой и скоростью роста солидных опухолей в течение 30–35 сут и оценивали показатели развития новообразования: 1) торможение роста опухоли (ТРО), считая клинически значимым уровень  $>50\%$ ; 2) индекс роста опухоли (ИРО); 3) скорость роста опухоли по среднему относительному объему опухоли и среднему времени пятикратного увеличения опухоли; 4) увеличение продолжительности жизни (УПЖ), клинически значимый уровень считали  $>25\%$ .

При облучении солидных АКЭ у мышей *in vivo* было установлено статистически значимое подавление роста солидной опухоли АКЭ как после облучения ПИ, так и при комбинированном воздействии с АраЦ, начиная с 5 сут после облучения ( $p \leq 0,05$ ). Наибольшие различия в средних объемах опухолей в группах «10 Гр» и «контроль» были

в 2,4 и 1,9 раза на 5 и 10 сут после облучения, а начиная с 15 сут, наблюдали уменьшение ТРО. Объемы опухолей в группе «АраЦ+10 Гр» отличались от «контроля» в 3,1 и 2,5 раза на 5, 10–15 сут соответственно и в 2 раза на 20 сут. На 25 сут после облучения значение ТРО в обработанных группах было меньше, чем 50%, то есть противоопухолевое действие ПИ и в комбинации с АраЦ на терминальной стадии роста опухоли было клинически не достоверно. Наблюдали снижение площади под кинетической кривой роста опухоли в группе «10 Гр» в 1,7 раз, а в группе «10 Гр+АраЦ» в 2,1 раза по сравнению с контролем. Различия в значениях ИРО для обработанных групп по сравнению с контролем были статистически значимы ( $p \leq 0,05$ ). Выявлено достоверное различие времени 5-кратного увеличения объема опухоли в обработанных группах по сравнению с контролем: в группе «10 Гр» –  $16,2 \pm 4,5$  сут, в группе «АраЦ + 10 Гр» –  $19,0 \pm 5,7$  сут, в контроле –  $10,0 \pm 3,3$  сут. Торможение скорости опухолей в обработанных группах мышей привело к увеличению СПЖ: значение УПЖ в группе «10 Гр» было 32%, а в «АраЦ+10 Гр» – 56%.

После облучения асцитных клеток *ex vivo* подавление роста солидной АКЭ наблюдалось с 5 сут, как в группе только после действия ПИ, так и группе «АраЦ+10 Гр». Наибольшие различия от контроля в средних объемах опухолей наблюдали на начальных этапах роста АКЭ: на 5 сут после облучения в группах «10 Гр» и «АраЦ+10 Гр» различия были в 11 раз, а в группе «АраЦ» объемы опухолей отличались от «контроля» в 7,7 и 6,0 раза на 10 и 15 сут соответственно. Снижение площади под кинетической кривой роста опухолей в группе «10 Гр» было в 1,6 раза, а в группе «АраЦ+10 Гр» в 3 раза относительно контроля. ИРО по сравнению с контролем в группе «10 Гр» был ниже на 39%, а в группе «АраЦ+10 Гр» – на 66%. Так же наблюдали достоверное увеличение среднего времени 5-кратного увеличения объема опухоли в обработанных группах: в группе мышей «10 Гр» –  $15,1 \pm 4,2$  сут, в группе «АраЦ + 10 Гр» –  $18,3 \pm 6,1$  сут, «АраЦ» –  $13,5 \pm 3,2$  сут, а у контроля –  $10,0 \pm 3,3$  сут. Значение УПЖ в группе «10 Гр» составило 72%, а при сочетанном воздействии АраЦ+10 Гр эффект был 109,7 %.

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, участия кислородных условий и микроокружения опухоли при облучении *ex vivo* и *in vivo*. Предложенный подход облучения опухолевых клеток вне организма с последующей имплантацией мышам для индукции роста солидной опухоли, использованный для решения задач поиска оптимальных условий для ПТ и исследования механизмов модифицирующего действия АраЦ на противоопухолевые процессы, продемонстрировал новые возможности не только для дальнейшего развития этой модели [4], но и намечил новые пути раскрытия потенциала АраЦ.

Исследования выполнены в рамках договора НИР № 090-02198 с Объединенным институтом ядерных исследований (Дубна, Россия).

1. Газиев А. И. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014. Т. 54, № 3, с. 229–240.
2. Борейко А. В., Заднепрянец М. Г., Чаусов В. Н., и др. *Письма в ЭЧАЯ*. 2023. Т. 20, № 4(249), с. 698–708.
3. Замулаева И. А., Матчук О. Н., Селиванова Е. И., и др. *Письма в журнал Физика элементарных частиц и атомного ядра*. 2023. Т. 20, №1, с. 70–71
4. Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Белякова Т.А., и др. *Биофизика*. 2024. Т. 69, №1, с. 183–192.