

*Е. А. Насонова*

## Совместные исследования ЛРБ ОИЯИ и биофизического отдела GSI (Дармштадт, Германия)

Около 20 лет продолжают совместные исследования ЛРБ и отдела биофизики GSI (Дармштадт, Германия). Отдел представляет собой междисциплинарную коллаборацию биологов, физиков, химиков, биохимиков и инженеров. Биофизические исследования в GSI были начаты в 1975 г. и долгие годы возглавлялись профессором Герхардом Крафтом. С 2008 г. отделом руководит профессор Марко Дюранте. Исследовательские интересы отдела сосредоточены на изучении физических характеристик и биологических аспектов действия корпускулярной радиации. Пучки тяжелых ионов, получаемых на ускорителях института, используются для изучения клеточных, хромосомных и молекулярных повреждений и их биологических последствий. Основные установки: линейный ускоритель UNILAC

(ионы от протонов до урана с энергией  $E < 15$  МэВ/нуклон и линейной передачей энергии (ЛПЭ) 10–15000 кэВ/мкм) и синхротрон SIS (ионы от протонов до урана с энергией  $E = 50$ –2000 МэВ/нуклон). Недавно получена возможность облучать биологические объекты ионным микропучком: отдельные клетки позиционируют и облучают желаемым числом ионов с точностью попадания до 1 мкм. Ядра клеток и поврежденные локусы окрашивают флуоресцентными красками и анализируют с помощью конфокальной микроскопии.

Изучение биологического действия тяжелых заряженных частиц имеет важнейшее значение для радиационной защиты от космического излучения при длительных орбитальных и межпланетных полетах и для

*E. Nasonova*

## The Cooperation between JINR LRB and the GSI Biophysics Department (Darmstadt, Germany)

The cooperation between LRB and the GSI Biophysics Department (Darmstadt, Germany) has entered its third decade. The Biophysics Department at GSI is an interdisciplinary collaboration of biologists, physicists, chemists, biochemists, and engineers. Biophysical research at GSI started in 1975 and was headed for several decades by Professor Gerhard Kraft. Since 2008, the GSI Biophysics Department has been headed by Professor Marco Durante. The research activities of the Department comprise physical and biological aspects of heavy charged particle radiation. GSI accelerators are used to study cellular, chromosomal, and DNA damages and their biological consequences. The main facilities are the UNILAC linear accelerator (ions

from protons to uranium; energy below 15 MeV/nucleon, LET 10–15000 keV/ $\mu$ m) and the SIS heavy-ion synchrotron (ions from protons to uranium; energy range 50–2000 MeV/nucleon). The microbeam facility was recently optimized for the irradiation of biological samples. Individual single cells can be automatically detected, positioned, and irradiated with a predefined number of ions and precision of the order of 1  $\mu$ m. The cell nuclei and damaged loci are stained with fluorescent dye and detected by confocal laser scanning microscopy.

The knowledge of the biological action of particles is of fundamental importance for radiation protection, especially against cosmic radiation in the long-term orbital and

новейших применений тяжелых ионов в медицине, например, для радиотерапии опухолей, развиваемой отделом биофизики GSI.

Радиотерапия рака началась в декабре 1997 г. с облучения двух пациентов ускоренными ионами углерода, и к настоящему времени в GSI курс облучения прошли более 400 пациентов с хорошими результатами. Для использования тяжелых ионов в терапии рака физические свойства ионных пучков должны быть досконально изучены. В многочисленных экспериментах изучались дозовое распределение по глубине, фрагментация ядер пучка и выход нейтронной компоненты. Разработаны методы биологической дозиметрии, с помощью которых верифицировались схемы облучения пациентов. Внедренные в GSI технические усовершенствования, такие как новая система формирования пучка «Rasterscan» с меняющейся энергией частиц, позволяющая облучать опухоль, не затрагивая окружающие нормальные клетки, также внесли свою лепту в успех проекта.

В настоящее время в отделе ведутся радиобиологические исследования, направленные на изучение клеточной выживаемости, клеточного цикла и его регуляции, повреждения и репарации ДНК и хромосомных

аббераций, биофизическое моделирование (<https://www.gsi.de/forschung/bio>).

Совместные исследования ОИЯИ и GSI касаются изучения генетических эффектов заряженных частиц. Как известно, наиболее чувствительной мишенью при облучении живой клетки является носитель ее генетической информации — ДНК. Хромосомные абберации являются наиболее чувствительным индикатором радиационно-индуцированных генетических нарушений. Их изучение дает представление о механизмах действия радиации на клеточном уровне и позволяет оценивать риски, связанные с облучением, в частности, риск образования радиационно-индуцированного рака. Это особенно важно при планировании пилотируемых полетов на Луну и Марс, а также для применения ионных пучков в терапии рака [1]. Кроме того, частота аббераций используется для ретроспективной оценки полученной человеком дозы облучения.

В совместных экспериментах исследовались цитогенетические эффекты ионов от углерода до ксенона в широком диапазоне ЛПЭ от 10 до 4000 кэВ/нм в клетках млекопитающих и человека с использованием традиционных и новейших цитогенетических методов [1, 2]. Было показано, что облучение тяжелыми частицами тормозит продвижение клеток по циклу и

interplanetary flights; the use of long-lived radioactive isotopes; and novel applications of particle beams in medicine like heavy-ion tumour therapy developed in the last twenty years at the Biophysics Department.

Tumour radiotherapy started in December 1997 with the treatment of the first two patients. Since then, more than 400 patients have been treated at GSI with good results. Using heavy-ion radiation in tumour therapy requires deep knowledge of the physical properties of ion beams. Many experiments are thus focused on depth-dose distributions (so-called Bragg curves), beam fragmentation, and neutron production. In addition to physical dosimetry, tools of biological dosimetry have been developed where treatment plans are verified by means of cell survival experiments. Furthermore, technical developments have contributed significantly to the success of the heavy-ion therapy project: a new beam delivery system (the Rasterscan system) allows an intensity-modulated particle treatment of tumors without unnecessary dose deposition in the surrounding normal tissues.

The Department works now in the following radiobiology-related research areas: cell survival measurements; cell cycle progression and cellular signaling; DNA damage

and repair; biophysical modeling; and chromosome aberrations (<https://www.gsi.de/forschung/bio>).

Extended joint research performed by JINR and GSI is concerned with the evaluation of the genetic effects of charged particles. During the exposure of cells to ionizing radiations, the most sensitive and critical target in the living cell is DNA, which carries the cell's genetic information. In the higher organisms, DNA is organized in chromosomes which become visible during cell division (mitosis) when they are highly condensed. At this stage, chromosomes are usually examined by light microscopy. Chromosome aberrations are regarded as the most sensitive indicator of radiation-induced genetic alterations. Investigations of chromosome aberrations provide valuable insights into the mechanisms of radiation action at the cellular level and allow the estimation of the possible health risks associated with radiation exposure such as cancer induction. This is particularly important for the planning of manned missions to the Moon and Mars and for the application of particle beams in cancer therapy [1]. Furthermore, aberration yields are used to estimate the dose to which an individual was accidentally exposed (retrospective biological dosimetry).

вступление в митоз, причем длительность задержки пропорциональна числу aberrаций в клетке, так что сильно поврежденные клетки достигают первого пострadiационного митоза гораздо позже, чем слабо поврежденные или неповрежденные. Таким образом, регистрируемый уровень хромосомных aberrаций зависит от времени фиксации, что является результатом неравномерного распределения поглощенной энергии плотноионизирующего излучения в клетке. Поэтому применяется метод множественных фиксаций для наиболее полного анализа облученной популяции. Разработан также новый эвристический математический подход, позволяющий количественно оценивать хромосомные повреждения во всей облученной популяции [3, 4]. Коэффициенты относительной биологической эффективности (ОБЭ) тяжелых ионов с высокими ЛПЭ, рассчитанные на основе этого анализа, были значительно выше полученных в других исследованиях, где фиксация и анализ aberrаций проводились одновременно после облучения согласно стандартной методике, утвержденной МАГАТЭ. Проведенные эксперименты со всей очевидностью показали, что такой подход неминуемо ведет к недооценке эффективности излучений с высокой ЛПЭ.

В совместных экспериментах исследована не только индукция aberrаций в облученных клетках, но и частота повреждений в потомках облученных клеток. Изучены также специфические для каждого типа клеток факторы, влияющие на регистрируемый уровень aberrаций, такие как апоптоз (запрограммированная гибель клеток) у лимфоцитов и преждевременная дифференцировка и старение у фибробластов. Наряду с традиционным метафазным методом (рис. 1) в настоящее время нами широко используется современный эффективный метод многоцветной флуоресцентной гибридизации mFISH (рис. 2). Он позволяет анализировать перестройки хромосом во всем геноме, включая стабильные и комплексные (вовлекающие несколько хромосом) aberrации, которые не видны при обычном окрашивании. Комплексные aberrации рассматриваются как маркеры плотноионизирующего излучения.

Стандартные и современные цитогенетические методы используются в течение последних четырех лет для мониторинга хромосомных нарушений в крови пациентов, проходящих курс радиотерапии рака простаты пучками углерода и/или фотонов [5]. В исследованиях, проведенных совместно ЛРБ и GSI, повышенный уровень aberrаций у больных, облученных ионами углерода, не обнаружен. Планируются дальнейшие

In joint LRB–GSI experiments, the cytogenetic effects of C to Xe ions have been investigated in a wide LET range (10 to 4000 keV/nm) in mammalian and human cells using numerous advanced and traditional cytogenetic methods [1, 2]. It was shown that high-LET irradiation delayed cell cycle progression and the entry of cells into mitosis according to the actual aberration burden of the cell. Thus, the expression of chromosomal damage was found to be time-dependent; i.e., heavily damaged cells have been shown to reach mitosis later than undamaged or slightly damaged ones. This results from a non-random spatial energy distribution along the particle track. To account for this time-dependent expression of chromosomal damage, we used the multiple fixation regimen and developed a novel mathematical approach based on the integration analysis to estimate the damage induced within the entire cell population [3, 4]. This method yields more reliable relative biological effectiveness (RBE) values which were significantly higher than those obtained in other cytogenetic studies, where, according to the standard protocol, single-fixation regimen was used to quantify high LET-induced aberrations. We have demonstrated that it unavoid-

ably leads to the underestimation of biological effectiveness of high-LET radiation.

Joint LRB–GSI experiments were also focused on both the induction of aberrations in the first cell generation after exposure and the transmission of aberrations to later cell generations. Furthermore, cell-type specific factors modifying the expression of aberrations such as apoptosis (programmed cell death) in lymphocytes or premature differentiation and senescence in fibroblasts have been studied to gain deeper insights into the fate of injured cells. Along with traditional metaphase analysis (Fig. 1), a new powerful method of multicolor fluorescence in-situ hybridization (mFISH) is now used (Fig. 2). The mFISH allows analyzing rearrangements in the whole karyotype including stable (transmissible) and complex (involving numerous chromosomes) aberrations, which are undetectable by conventional microscopy. The latter are regarded as a fingerprint of high-LET radiation.

These advanced and traditional cytogenetic methods have been used during the last four years for the monitoring of chromosome damage in the blood of prostate cancer patients treated with carbon and/or photon beams [5]. Joint LRB–GSI research revealed no higher aberration yield in

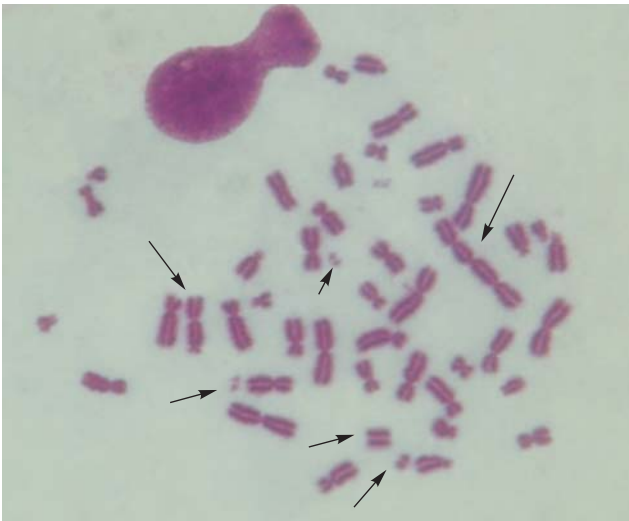


Рис. 2. Определение aberrаций с помощью метода многоцветной флуоресцентной гибридизации mFISH. Здесь показан человеческий кариотип с двумя сложными aberrациями

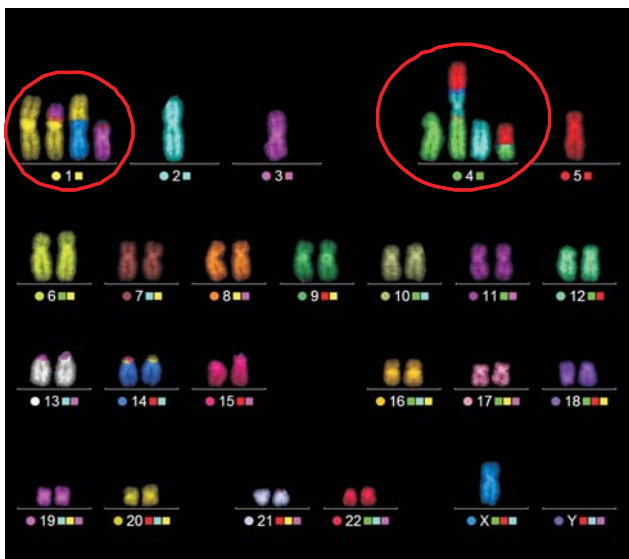


Fig. 2. Detection of aberrations by multicolor fluorescence in situ hybridization (mFISH). Here, a human karyotype with two complex aberrations is shown

the blood of carbon ion-treated patients. Further mFISH studies are planned to analyze the complexity of chromosome damage induced by high-LET particles.

Future projects of the Department are focused on radiation risks that astronauts will be exposed to on a Mars mission, the biological effects of ion beams on the human genome, and determining how these effects would manifest themselves over time. The European Space Agency (ESA) has chosen the GSI accelerator facility to accomplish this task. Joint work in this field will be continued.

Рис. 1. Определение aberrаций с помощью традиционного метода окрашивания. Данная клетка содержит множественные aberrации (показаны стрелками), включающие дигетрические и трицентрические хромосомы и ацентрические фрагменты

Fig. 1. Detection of aberrations by conventional staining. The cell (a human lymphocyte) carries multiple aberrations (showed by arrows) including dicentric and tricentric chromosomes and acentric fragments

mFISH-исследования сложности хромосомных повреждений, индуцируемых излучениями с высокой ЛПЭ.

Будущие проекты отдела биофизики GSI в основном сфокусированы на оценке радиационных рисков космонавтов во время планируемой миссии на Марс, влияния тяжелых ионов и отдаленных последствий облучения на геном человека. Европейское космическое агентство ESA избрало базовые установки GSI для решения этой задачи. Совместные работы в этой области будут продолжены.

#### Список литературы / References

1. *Nasonova E., Ritter S.* Cytogenetic Effects of Densely Ionizing Radiation in Human Lymphocytes: Impact of Cell Cycle Delay // *Cytogenet. Genome Res.* 2004. V. 104, No. 1–4. P. 216–220.
2. *Nasonova E., Fuessel K., Berger S., Gudowska-Nowak E., Ritter S.* Cell Cycle Arrest and Aberration Yield in Normal Human Fibroblasts: I. Effects of X-rays and 195 MeV · u<sup>-1</sup> C Ions // *Int. J. Radiat. Biol.* 2004. V. 80. P. 621–634.
3. *Ritter S., Nasonova E., Gudowska-Nowak E., Scholz M., Kraft G.* High LET Induced Chromosome Aberrations in V79 Cells Analysed in First and Second Postirradiation Metaphases // *Int. J. Radiat. Biol.* 2000. V. 76. P. 149–161.
4. *Ritter S., Nasonova E., Gudowska-Nowak E., Scholz M., Kraft G.* Erratum. Integrated Chromosome Aberration Yields Determined for V79 Cells after High LET Radiation // *Int. J. Radiat. Biol.* 2002. V. 78. P. 1063–1064.
5. *Hartel C., Nikoghosyan A., Durante M., Sommer S., Nasonova E., Fournier C., Lee R., Debus J., Schulz-Ertner D., Ritter S.* Chromosomal Aberrations in Peripheral Blood Lymphocytes of Prostate Cancer Patients Treated with IMRT and Carbon Ions // *Radiotherapy and Oncology.* 2009, 30 Sept. (Epub ahead of print).