

На правах рукописи

**ЗАЙЦЕВА**

**Екатерина Михайловна**

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОТОННОГО  
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПУЧКА С ЭНЕРГИЕЙ 170 МЭВ  
НА КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА**

**03.01.01– Радиобиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Обнинск – 2012**

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии  
Объединенного института ядерных исследований.

**Научный руководитель:** - кандидат биологических наук  
**Говорун Раиса Дмитриевна**

**Официальные оппоненты:** - доктор биологических наук, профессор  
**Пелевина Ирина Ивановна,**

- доктор биологических наук, профессор  
**Севанькаев Александр Васильевич**

**Ведущая организация:** ГНЦ РФ Институт медико-биологических  
проблем Российской академии наук.

Защита состоится 24 апреля 2012 года в 11.00 часов на заседании  
диссертационного совета Д 208.132.01 при Федеральном государственном  
бюджетном учреждении «Медицинский радиологический научный центр»  
Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации  
по адресу: 249036, г. Обнинск Калужской области, ул. Королева, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Медицинский  
радиологический научный центр» Минздравсоцразвития России.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Палыга Г.Ф.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Лучевая терапия является одним из основных методов лечения в онкологии. По данным Российского онкологического научного центра им. Н.Н.Блохина РАМН она рекомендуется в 50-70 % случаев заболевания как самостоятельно, так и в комбинации с другими видами лечения (хирургия, химиотерапия). Важнейшей задачей при ее проведении является минимизация повреждений здоровых тканей с максимальным поражением тканей опухоли. В связи с этим, все более широкое распространение в онкологической практике приобретает протонная лучевая терапия. Она является одним из наиболее перспективных и быстро развивающихся направлений в современной ядерной медицине.

По сравнению с обычно используемыми электромагнитными видами излучений протоны обладают рядом преимуществ. При прохождении через биологические ткани они формируют треки, в пределах которых расходуют энергию на ионизацию и возбуждение атомов и молекул. Процесс сопровождается замедлением движения и уменьшением остаточной энергии частиц, что обуславливает возрастание плотности ионизации с максимумом на конечном участке пробега в области пика Брэгга. Такая особенность их энерговыделения с реализацией «Брэгговского максимума» в конце пробега создает условия для оптимального формирования дозы в тканях опухолей с максимальным повреждением их клеток при облучении в области пика Брэгга и минимальным повреждением окружающих тканей и тканей по ходу пучка частиц до места локализации опухоли. Такой терапевтический протонный пучок впервые в России был создан в Объединенном институте ядерных исследований на синхротронном ускорителе Лаборатории ядерных проблем в 1967 году (Джелепов В. П. и др., 1975) и в течение длительного периода используется для проведения лучевой терапии пациентов.

Поскольку ведущая роль в развитии лучевых повреждений клеток млекопитающих и человека в их постлучевой гибели принадлежит структурным нарушениям хромосом, изучение закономерностей образования хромосомных aberrаций при проведении протонной лучевой терапии имеет несомненное значение и представляется важной задачей. Весьма актуальной является проблема нормирования лучевых нагрузок на пациентов при проведении протонной лучевой терапии. Остаются недостаточно изученными вопросы о соотношении выхода структурных aberrаций хромосом в неделящихся клетках нормальных тканей по ходу пучка частиц и в делящихся клетках опухолей. Эти обстоятельства определили проведение настоящего исследования.

В качестве модели для исследования повреждений хромосомного аппарата клеток человека использована культура лимфоцитов периферической

крови человека. Тест-система для цитогенетического анализа хромосом человека рекомендована Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) для исследования влияния неблагоприятных факторов окружающей среды на клетки человека и на наследственность. Как известно, в периферической крови человека лимфоциты не делятся и находятся в состоянии покоя или пресинтеза ДНК. Однако под действием фитогемагглютина (ФГА) Т-лимфоциты в условиях культивирования способны к трансформации с последующим митотическим делением. Важным обстоятельством является также то, что выход aberrаций хромосом в лимфоцитах крови человека при воздействии ионизирующих излучений практически совпадает *in vitro* и *in vivo* (Brewen J.G. and Gengozian N., 1971; Buckton K.E. et al., 1971; Schmid E. et al., 1974). Использование культуры лимфоцитов в таких исследованиях позволяет избежать вынужденных экстраполяций и оговорок, неизбежно возникающих при интерпретации результатов, полученных на других объектах.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы является сравнительное цитогенетическое исследование действия протонов терапевтического пучка фазотрона с исходной энергией 170 МэВ на неделящиеся клетки человека и протонов в области пика Брэгга на клетки в разных фазах клеточного цикла.

Для её выполнения поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный количественный анализ частоты образования клеток с хромосомными aberrациями, общего числа и разных видов aberrаций хромосом в лимфоцитах крови человека при действии протонов терапевтического пучка на входе в объект и в области пика Брэгга.
2. Исследовать характер дозовых зависимостей частоты образования клеток с хромосомными aberrациями и общего числа aberrаций хромосом в лимфоцитах, облученных в разных фазах клеточного цикла протонами терапевтического пучка на входе в объект и в области пика Брэгга.
3. Исследовать закономерности возникновения разных видов нестабильных aberrаций хромосом в лимфоцитах, облученных в разных фазах клеточного цикла протонами терапевтического пучка на входе в объект и в области пика Брэгга.
4. Провести оценку величины ОБЭ протонов терапевтического пучка с исходной энергией 170 МэВ и в области пика Брэгга по частоте возникновения клеток с хромосомными aberrациями и общему числу aberrаций при облучении лимфоцитов в  $G_0$ -фазе клеточного цикла.
5. Оценить биологическую эффективность протонов в области пика Брэгга при облучении делящихся лимфоцитов по сравнению с воздействием протонов с энергией 170 МэВ на неделящиеся клетки.

### **Положения и результаты, выносимые на защиту:**

1. Цитогенетическими методами выявлены количественные и качественные особенности образования разных видов структурных нарушений хромосом в лимфоцитах периферической крови человека, облученных в разных фазах клеточного цикла протонами терапевтического пучка с исходной энергией 170 МэВ и в области пика Брэгга.
2. Исследована роль физического фактора при воздействии протонов исходного пучка с энергией 170 МэВ и в области пика Брэгга, которая определяется различиями их линейной передачи энергии. Оценка по цитогенетическим показателям относительной биологической эффективности протонов терапевтического пучка при облучении неделящихся клеток (в  $G_0$ -фазе клеточного цикла) показала, что коэффициент ОБЭ протонов исходного пучка равен  $1,0 \pm 0,03$ , а протонов в области пика Брэгга –  $1,2 \pm 0,1$ .
3. Выявлена роль биологического фактора в эффективности протонного терапевтического пучка, которая определяется различием в радиочувствительности неделящихся и делящихся клеток. Показана наиболее высокая эффективность протонов в области пика Брэгга при облучении лимфоцитов в  $G_2$ -фазе клеточного цикла.
4. С учетом вклада в эффект фракции высоко радиочувствительных  $G_2$ -облученных лимфоцитов коэффициент эффективности протонов терапевтического пучка в области пика Брэгга по сравнению с воздействием протонов-170 МэВ на неделящиеся клетки составил  $1,45 \pm 0,10$ .

### **Научная новизна.** В работе впервые:

– Исследована роль физического и биологического факторов в биологической эффективности протонов терапевтического пучка с энергией 170 МэВ.

– Выявлена наиболее высокая радиочувствительность лимфоцитов в  $G_2$ -фазе клеточного цикла при облучении протонами в области пика Брэгга.

– Проведена оценка биологической эффективности протонов в области пика Брэгга при облучении делящихся клеток по сравнению с действием протонов с исходной энергией 170 МэВ на неделящиеся клетки. По аналогии с ОБЭ рассчитан коэффициент эффективности протонов в области пика Брэгга с учетом вклада в эффекты фракции наиболее радиочувствительных  $G_2$ -облученных лимфоцитов.

**Научно-практическая значимость работы.** Результаты исследования имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Они пополняют сведения о радиочувствительности клеток человека в разных фазах клеточного цикла при воздействии корпускулярными видами излучений с разной линейной передачей энергии. Выявленные количественные и качественные

характеристики действия протонов терапевтического пучка на клетки человека могут использоваться при оценке воздействия корпускулярными ионизирующими излучениями с разными ЛПЭ, в том числе при проведении лучевой терапии. Количественный учет нестабильных хромосомных aberrаций может рассматриваться как один из надежных критериев при разработке и применении методов радиотерапии. Результаты исследования способствуют пониманию процессов формирования хромосомных повреждений в клетках опухолевых и здоровых тканей при проведении лучевой терапии протонами высоких энергий. Полученные данные могут быть полезными при планировании курсов лучевой терапии, при расчетах оптимальных доз лучевого воздействия.

**Апробация работы.** Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на 12 конференциях: Всеросс. конф. «Радиобиологические основы лучевой терапии». Москва. 2005; Second Int. Conf. “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution”. Yerevan, Armenia. 2005; 13-я и 15-я научн. конф. студентов, аспирантов и молодых специалистов. Дубна. 2005, 2008; XV Междунар. научно-практ. конф. «Экология человека в постчернобыльский период». Минск, Беларусь. 2007; Fourth international Summer School on Nuclear Physics Methods and Accelerators in Biology and Medicine. Prague, Czech Rep. 2007; VII Конф. молодых ученых, специалистов и студентов. Москва. 2008; 13-я научн. конф. молодых ученых и специалистов ОИЯИ. Дубна. 2009 (доклад отмечен второй премией в номинации научно-исследовательские экспериментальные работы); IX Междунар. школа по радиобиологии для молодых ученых. Обнинск. 2009; Fifth international Summer School on Nuclear Physics Methods and Accelerators in Biology and Medicine. Bratislava, Slovak Rep. 2009; 37th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Prague. Czech Rep. 2009; VI Съезд по радиационным исследованиям. Москва. 2010 (доклад отмечен первой премией в конкурсе молодых ученых – секции X «Радиобиология тяжелых ионов»).

Апробация диссертации состоялась на заседании научно-технического совета Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ РАН 20 октября 2011г. (протокол № 76).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 14 работ, 2 статьи опубликованы в журнале, рекомендованном ВАК МОиН РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 128 страницах, состоит из введения, 4-х глав, выводов, заключения; содержит 10 таблиц и 26 рисунков. Список литературы включает 75 наименований на русском и английском языках.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использована кровь 11 здоровых доноров (мужчин и женщин) 25-45 лет. Лимфоциты культивировали по общепринятой методике в полной питательной среде (ППС): среда RPMI-1640 (80%), фетальная сыворотка теленка (20%), глутамин (1%), антибиотики пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Для стимуляции деления клеток в ППС добавляли ФГА (15 мкг/мл).

Облучение клеток проводили протонами терапевтического пучка фазотрона ОИЯИ с энергией 170 МэВ, подготовленного для проведения лучевой терапии пациентов. Облучали в двух точках глубинного дозного распределения – на входе пучка в объект и в области пика Брэгга. ЛПЭ протонов-170 МэВ составила 0,49 кэВ/мкм, мощность дозы – 0,7 Гр/мин. С помощью специального устройства (гребенчатый фильтр) пик Брэгга протонов модифицирован по 90%-му изоуровню мощности дозы – расширен до 2 см. Спектр энергии замедленных протонов – 0-30 МэВ. Мощность дозы составляла ~1,3 Гр/мин. В спектре ЛПЭ вклад в поглощенную дозу протонов с низкой ЛПЭ составил ~ 67%, с ЛПЭ 25-50 кэВ/мкм ~ 23% и с высокой ЛПЭ (50-100 кэВ/мкм) ~ 10%. Для сравнения проведено  $\gamma$ -облучение  $^{60}\text{Co}$  на аппарате для дистанционной лучевой терапии РОКУС-М с мощностью дозы 0,9 Гр/мин.

Радиочувствительность неделящихся лимфоцитов ( $G_0$ -фаза клеточного цикла) исследовали в облученных образцах цельной крови и суспензии лимфоцитов в ППС (ФГА добавляли сразу после облучения), фиксировали через 48 ч. Для изучения радиочувствительности лимфоцитов в разных фазах клеточного цикла культуру клеток облучали через 15-16 ч ( $G_1$ -фаза), 30-32 ч (S-фаза), 47-47,5 ч ( $G_2$ -фаза) после стимуляции к делению. Продолжительность культивирования  $G_1$ - и S-облученных лимфоцитов составляла 50 ч.,  $G_2$ -облученных – 58ч. Для выявления первых постлучевых митозов в среду добавляли раствор BrdU (20 мкМ). Клетки окрашивали по ФПГ-методике (флюоресценция + Гимза). В  $G_2$ -облученных лимфоцитах дополнительно исследовали хромосомные нарушения РСС-методом (преждевременная конденсация хроматина): сразу после облучения в культуру клеток добавляли каликулин-А (50 нМ). При микроскопировании учитывали все виды аберраций хромосом, выявляемых без кариотипирования. Анализ аберраций проводили по общепринятой классификации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нарушения хромосомного аппарата лимфоцитов периферической крови человека исследовали после облучения протонами терапевтического пучка фазотрона, подготовленного для проведения лучевой терапии пациентов с онкологическими заболеваниями. Клетки облучали протонами с исходной

энергией 170 МэВ в двух точках глубинного дозного распределения – на входе пучка в объект и в области модифицированного пика Брэгга. Такой подход позволял, в определенной степени, моделировать условия облучения, соответственно, клеток здоровых тканей до места локализации опухоли и непосредственно клеток опухолевых тканей.

Исследована роль физического фактора в реакции клеток человека на действие протонов терапевтического пучка. Она определяется различными значениями ЛПЭ протонов-170 МэВ и в области пика Брэгга. При облучении образцов неделящихся лимфоцитов (в  $G_0$ -фазе) протонами в области пика Брэгга наблюдаются более выраженные эффекты (рис. 1).

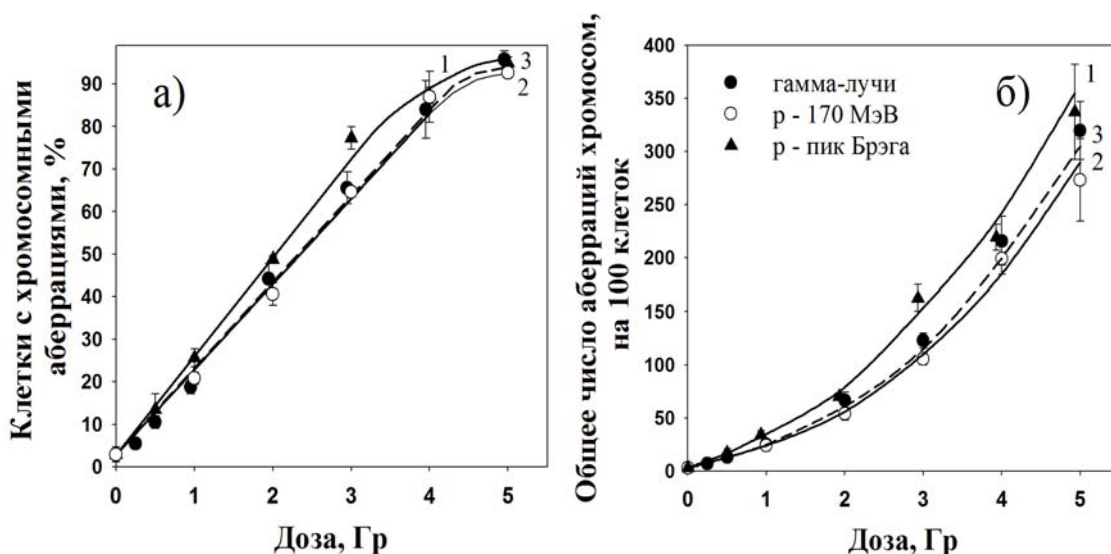


Рис. 1. Зависимость частоты образования клеток с хромосомными aberrациями (а) и общего числа aberrаций хромосом (б) в лимфоцитах крови человека от дозы облучения в  $G_0$ -фазе клеточного цикла протонами в области пика Брэгга (1), протонами с исходной энергией 170 МэВ (2) и  $\gamma$ -лучами (3).

Зависимость частоты образования клеток с хромосомными aberrациями (рис. 1а) имела линейный характер в диапазоне доз до  $\sim 4,5$  Гр при воздействии протонами на входе и до  $\sim 3,5$  Гр при облучении в области пика Брэгга, т.е. до уровня  $\sim 90$  % поврежденных клеток. При более высоких дозах происходило насыщение эффекта, и кривая выходила на плато. Показана степенная зависимость общего числа возникающих хромосомных aberrаций с увеличением дозы облучения (рис. 1б). Для сравнения на рисунке приведены соответствующие кривые при  $\gamma$ -облучении. По этим цитогенетическим тестам не выражены различия при облучении протонами с исходной энергией 170 МэВ и  $\gamma$ -излучением: величина ОБЭ протонов составила  $1,0 \pm 0,03$ . Для протонов в области пика Брэгга она повышалась до  $\sim 1,2 \pm 0,1$ .



При анализе разных видов нарушений хромосом выявлен высокий уровень aberrаций обменного типа (~70%) с преобладанием дицентриков (~ 40% от общего числа). Частота их образования возрастает с увеличением дозы облучения. Не наблюдалось существенных различий при воздействии разных видов излучений. Но при высоких дозах протонов в области пика Брэгга отмечено снижение эффекта по сравнению с воздействием протонов-170 МэВ и  $\gamma$ -лучей. Очевидно, оно является следствием более продолжительной задержки деления клеток с увеличением в них числа дицентриков при воздействии протонами с более высокой ЛПЭ.

Число хроматидных и парных ацентрических фрагментов составляло ~ 35% от общего числа aberrаций. Частота их образования возрастала с увеличением дозы облучения, при этом наблюдался двухфазный характер дозовых кривых – при высоких уровнях доз эффекты существенно повышались. Это наиболее выражено у лимфоцитов, облученных протонами в области пика Брэгга. Мы полагаем, что двухфазный характер кривых для выхода парных фрагментов указывает на существенное увеличение фрагментоза хромосом при высоких дозах облучения. Увеличение фрагментоза хромосом отмечалось также другими авторами в исследованиях с использованием плотноионизирующих излучений по сравнению с воздействием редкоионизирующих (Тоцева А.М. и др., 1980; Fussel K. et al., 1997).

Известно, что основным фактором, определяющим применение протонов в лучевой терапии, является увеличение их ЛПЭ в области пика Брэгга, где непосредственно осуществляется облучение опухолевых тканей. Облучение биологических объектов протонами терапевтического пучка сопровождается замедлением движения частиц, уменьшением остаточной энергии и, как следствие, увеличением плотности ионизации с максимумом в области пика Брэгга. В ряде работ также было показано изменение биологической эффективности протонов в зависимости от энергии и от глубины прохождения в тканях (Тоцева А.М. и др., 1980; Courdi A. et al., 1994; Tang J.V. et al. 1997; Paganetti H., 2002). Оно определялось соответствующим ростом величин ЛПЭ. Наши данные по оценке ОБЭ протонов согласуются с результатами других исследований действия протонов разных энергий на клетки человека и млекопитающих (Говорун Р. Д. и др. 1973, 1982; Герасименко В. Н. и др., 1980; Тоцева А.М. и др. 1980; Витанова А. и др., 2002; Tang J.V. et al. 1997; Paganetti H., 2002). Сопоставление с результатами цитогенетических исследований реакции лимфоцитов на воздействие тяжелыми ионами с высокими значениями ЛПЭ (Красавин Е. А. и др. 2004), свидетельствуют о том, что полученные в работе величины ОБЭ протонов в области пика Брэгга соответствуют воздействию ускоренными тяжелыми ионами с ЛПЭ ~ 11-12 кэВ/мкм на неделящиеся лимфоциты, например, ионами  $^{12}\text{C}$  с энергией 473 МэВ/нуклон.

Полученные величины ОБЭ отражают различия физических характеристик протонов терапевтического пучка с исходной энергией 170 МэВ и в области пика Брэгга. Однако поскольку опухоли характеризуются процессами деления клеток, следует ожидать их более высокой радиочувствительности по сравнению с неделяющимися клетками здоровых тканей. Как известно, делящиеся клетки, особенно в некоторых фазах клеточного цикла, обладают повышенной чувствительностью к действию ионизирующих излучений (Севаньяев А. В., 1987). Поэтому величина ОБЭ протонов в области пика Брэгга без учета влияния такого биологического фактора не полностью отражает эффективность облучения клеток человека протонным терапевтическим пучком.

Нами проведено исследование влияния этого биологического фактора на уровень эффектов при облучении протонами в области пика Брэгга. Хромосомные aberrации анализировали в лимфоцитах, облученных в период прохождения ими разных фаз клеточного цикла и зафиксированных в общепринятые сроки (50 ч).

При облучении лимфоцитов в  $G_1$ - и S-фазах протонами 170 МэВ и  $\gamma$ -лучами частота образования клеток с хромосомными aberrациями линейно возрастала с увеличением дозы до 3,5-4 Гр. При дальнейшем увеличении дозы облучения наблюдается насыщение эффекта на уровне  $\sim 90$ -98% поврежденных клеток. Отмечена степенная дозовая зависимость общего числа возникающих хромосомных aberrаций. Вместе с тем, при облучении лимфоцитов в S-фазе цикла протонами-170 МэВ отмечено некоторое снижение эффекта при дозе 4 Гр, а при 5 Гр – делящиеся клетки не были выявлены. При этом радиочувствительность делящихся клеток в  $G_1$ - и S-фазах клеточного цикла по данным показателям была выше, чем неделящихся лимфоцитов в  $G_0$ -фазе. После облучения лимфоцитов в  $G_2$ -фазе доля клеток с хромосомными aberrациями и общее число aberrаций хромосом оказались сниженными по сравнению с клетками, облученными в других фазах, а при дозах 4-5 Гр делящиеся клетки отсутствовали.

После облучения  $G_2$ -лимфоцитов даже небольшими дозами протонов в области пика Брэгга на препаратах встречались лишь единичные делящиеся клетки (при общепринятом 50-часовом сроке их фиксации). Известно, что облучение клеток человека и млекопитающих приводит к задержке вступления их в деление, что сказывается как на митотической активности клеток, так и на уровне выявляемых aberrаций хромосом. Проведенный анализ выявил глубокую задержку деления  $G_2$ -облученных лимфоцитов. Для клеток, облученных в других фазах цикла, она была менее выражена, но с увеличением дозы также отмечается снижение их митотической активности.

Для выявления оптимального срока исследования лимфоцитов, облученных в  $G_2$ -фазе цикла протонами в области пика Брэгга были проведены

эксперименты с фиксацией клеток в разные сроки после воздействия. Полученные данные свидетельствуют о том, что значения митотического индекса повышались с увеличением продолжительности культивирования и становились практически равными контролю после 67-часового культивирования. Однако было отмечено появление клеток последующих митозов, уровень которых повышался с увеличением продолжительности культивирования клеток. Нами был выбран 58-часовой срок фиксации  $G_2$ -облученных лимфоцитов (10 ч. после облучения), когда основная их часть (~85%) проходила первый постлучевой митоз.

Цитогенетический анализ лимфоцитов, облученных в разных фазах клеточного цикла протонами в области пика Брэгга, показал (рис. 2), что при воздействии на лимфоциты в  $G_0$ - и  $G_1$ -фазах клеточного цикла частота образования aberrантных клеток, как и ожидалось, имеет линейную зависимость от дозы облучения в диапазоне доз 1-4 Гр (рис. 2а) с последующим

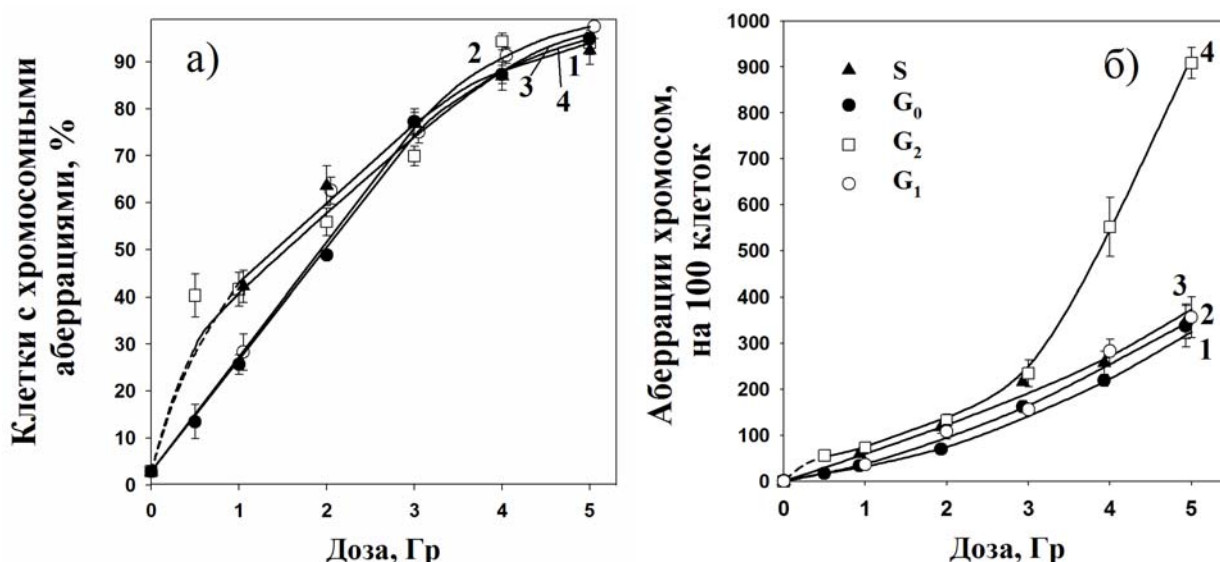


Рис. 2. Зависимость от дозы частоты образования лимфоцитов с хромосомными нарушениями (а) и общего числа aberrаций хромосом (б) после облучения в разных фазах клеточного цикла протонами терапевтического пучка в области пика Брэгга.

выходом на уровень насыщения в 95-99% поврежденных клеток. При облучении в S- и  $G_2$ -фазах цикла она существенно возрастает при небольших дозах (0,5 Гр) и затем быстро выходит на уровень насыщения. Такая закономерность отмечалась в других исследованиях воздействия излучений с высокими значениями ЛПЭ на неделящиеся лимфоциты – например ионами магния и азота с ЛПЭ ~39,8 и ~77 кэВ/мкм, соответственно (Красавин Е. А. и др., 2004). Выявленные нами эффекты служат показателем более высокой

радиочувствительности лимфоцитов в S- и G<sub>2</sub>-фазах клеточного цикла при воздействии протонами в области пика Брэгга.

Общее число возникающих в лимфоцитах aberrаций хромосом характеризуется степенной зависимостью от дозы (рис. 2б). Более высокие уровни эффектов отмечаются для G<sub>2</sub>-облученных лимфоцитов по сравнению с клетками, облученными в других фазах клеточного цикла. С увеличением дозы облучения различие становится более выраженным. Это отмечалось также в исследованиях других авторов (Джемилев З. А., 1967; Севанькаев А. В. и Лучник Н. В., 1973; Дубинина Л. Г., 1977; Carrano A. V., 1975). Существенных различий по частоте aberrаций хромосом в лимфоцитах, облученных в G<sub>1</sub>- и S-фазах цикла, не отмечено.

Нами проведен анализ распределения клеток с разным числом хромосомных aberrаций после облучения лимфоцитов протонами терапевтического пучка. Частота возникновения клеток с разным числом хромосомных aberrаций при облучении в G<sub>0</sub>-фазе клеточного цикла протонами-170 МэВ подчиняется нормальному распределению Пуассона, а после воздействия разных доз протонов в области пика Брэгга – распределению Пуассона или Неймана. Распределение G<sub>2</sub>-облученных клеток с разным числом aberrаций хромосом перестает соответствовать этим распределениям.

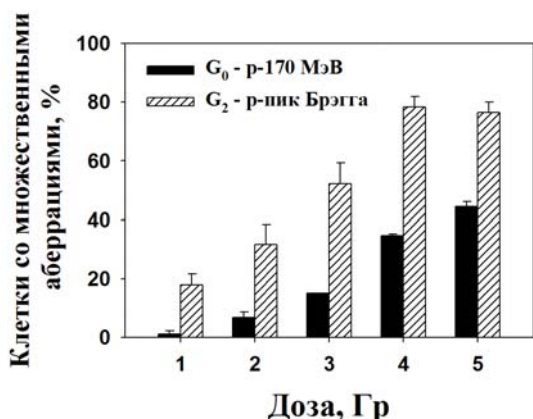


Рис. 3. Число лимфоцитов со множественными aberrациями хромосом ( $\geq 3$ ).

Анализ распределения числа aberrаций по клеткам при воздействии протонов в области пика Брэгга на G<sub>2</sub>-лимфоциты выявил высокий уровень клеток со множественными aberrациями хромосом (рис. 3). По сравнению с действием протонов-170 МэВ на G<sub>0</sub>-лимфоциты количество таких клеток увеличивается: в три и более раз при дозах облучения 1-3 Гр и в два раза - при высоких дозах. Оно нивелируется при высоких дозах, поскольку во все большем числе клеток возникают множественные хромосомные повреждения.

Выраженная задержка вступления в деление тяжело поврежденных клеток при облучении лимфоцитов в наиболее радиочувствительной G<sub>2</sub>-фазе клеточного цикла даже невысокими дозами может привести к тому, что часть из них вообще не достигает митоза (Ritter S. et al., 1994, Nasonova E., Ritter S., 2004). Об этом могут свидетельствовать результаты дополнительно проведенного нами исследования РСС-методом. Этот метод позволяет выявлять возникающие разрывы хромосом даже в таких тяжело поврежденных клетках. Их частота в несколько раз превышала уровень разрывов хромосом,

выявляемых метафазным методом, что особенно выражено при высоких дозах облучения.

Анализ лимфоцитов, облученных в разных фазах клеточного цикла, свидетельствует о существенном изменении соотношений между разными видами образующихся хромосомных aberrаций. Увеличение частоты их образования в  $G_2$ -облученных лимфоцитах определяется, прежде всего, повышением уровня aberrаций хроматидного типа. На их долю приходится до 70% от общего числа aberrаций, тогда как в  $G_0$ -облученных лимфоцитах их вклад не превышает 10%. Кроме того, при сравнении общего числа делеций и обменных aberrаций отмечается выраженный фрагментоз хромосом в  $G_2$ -облученных лимфоцитах (до 65-85% от общего числа aberrаций хромосом). Он определяется, прежде всего, высокой частотой образования хроматидных фрагментов. Выявлены также существенные изменения в соотношении образования aberrаций хромосом обменного типа. Для  $G_0$ -облученных лимфоцитов характерен высокий уровень дицентриков (и центральных колец) и встречаются лишь единичные хроматидные обмены. В  $G_1$ - и S-фазах цикла увеличивается количество обменов хроматидного типа. В  $G_2$ -облученных клетках отмечается существенное повышение уровня хроматидных обменных aberrаций при снижении образования дицентриков и колец. Частота образования тех и других видов aberrаций находилась на уровне 8-14% от общего числа, а при высоких дозах 4-5 Гр – примерно 4-7%.

Выявление обменных aberrаций хромосомного типа в  $G_2$ -облученных лимфоцитах может определяться двумя обстоятельствами: с одной стороны, рассинхронизацией популяции стимулированных к делению лимфоцитов к моменту облучения, с другой – отсроченной фиксацией клеток после облучения из-за выраженной задержки деления  $G_2$ -облученных клеток (до 58 ч). При микроскопировании, вероятно, обнаруживаются клетки, которые во время облучения могли еще находиться в S-фазе клеточного цикла. Очевидно, не всегда удавалось дифференцировать клетки в этих стадиях клеточного цикла при раздельном учете в них хромосомных aberrаций. При анализе препаратов нами выявлялось до 15-20% клеток в S-фазе клеточного цикла. Кроме того, не исключается вероятность того, что при прохождении трека плотноионизирующего протона могут повреждаться обе хроматиды, что создает условия для формирования и aberrаций хромосомного типа.

Нами проведен расчет биологической эффективности протонов терапевтического пучка в области модифицированного пика Брэгга с учетом вклада в эффекты от радиочувствительных  $G_2$ -облученных клеток. В качестве критериев использованы частота образования клеток с хромосомными aberrациями и общее число aberrаций хромосом. Оценку проводили с учетом фракции наиболее радиочувствительных лимфоцитов, находившихся во время облучения в  $G_2$ -фазе клеточного цикла. Величина этой фракции клеток нами

была принята пропорциональной продолжительности  $G_2$ -фазы лимфоцитов. В клеточном цикле лимфоцитов, равном 42 ч, ее продолжительность составляет  $\sim 6$  ч (Bender M. A. and Prescott D. M., 1962). Таким образом, ее доля составила 14,3 %. При расчете к значениям частоты образования лимфоцитов с хромосомными aberrациями и общего числа aberrаций хромосом, индуцированных протонами в области пика Брэгга в  $G_0$ -фазе клеточного цикла, добавлена 14,3%-я доля от соответствующих эффектов, полученных для  $G_2$ -облученных лимфоцитов. По этим данным построены расчетные кривые, приведенные на рисунке 4. Для сравнения здесь же показаны соответствующие кривые для лимфоцитов, облученных в  $G_0$ -фазе клеточного цикла протонами-170 МэВ и  $\gamma$ -лучами.

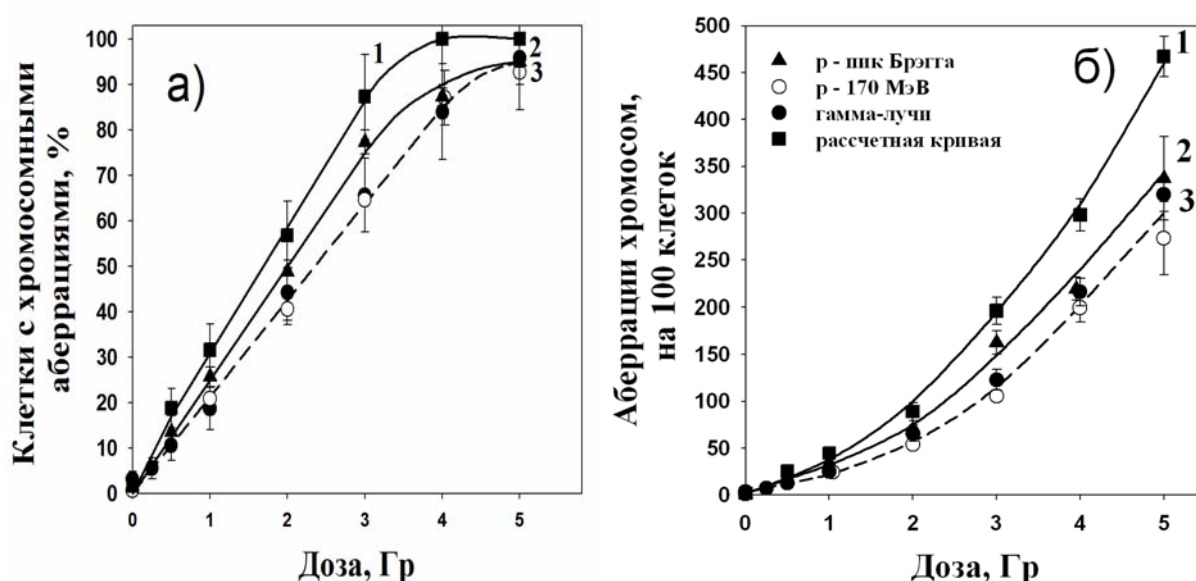


Рис. 4. Зависимость частоты образования лимфоцитов с хромосомными aberrациями (а) и общего числа aberrаций хромосом (б) от дозы облучения протонами терапевтического пучка: 1 - расчетная кривая с учетом вклада в эффекты доли радиочувствительной фракции  $G_2$ -лимфоцитов, облученных в области пика Брэгга; 2 - облучение неделящихся лимфоцитов в области пика Брэгга; 3 - облучение неделящихся лимфоцитов протонами с энергией 170 МэВ и  $\gamma$ -лучами.

По аналогии с расчетом величины ОБЭ были вычислены коэффициенты биологической эффективности протонов терапевтического пучка в области пика Брэгга с учетом вклада в эффекты более радиочувствительных  $G_2$ -облученных клеток. По соотношению доз при равных уровнях эффектов проведено сравнение с действием протонов-170 МэВ на неделящиеся клетки в  $G_0$ -фазе клеточного цикла (моделирует облучение здоровых тканей при протонной терапии). Таким образом, коэффициент биологической

эффективности протонов в области пика Брэгга при облучении асинхронной популяции клеток человека может повышаться до  $\sim 1,45 \pm 0,08$  (в диапазоне доз 1- 4 Гр).

Известно, что при проведении лучевой терапии облучение обычно проводится с нескольких направлений (до 7) до достижения требуемой терапевтической дозы. Этим достигается снижение воздействия на клетки здоровых тканей по ходу пучка протонов до места локализации опухоли. Эффекты облучения пучком протонов с исходной энергией 170 МэВ, в определенной мере, моделируют реакцию клеток здоровых тканей на воздействие сниженной дозы. Это достигается как облучением с нескольких направлений, так и меньшей величиной ОБЭ протонов исходного пучка относительно протонов пика Брэгга, а также меньшей радиочувствительностью неделящихся клеток нормальных тканей по сравнению с асинхронной популяцией клеток опухолей. Эффекты, выявленные нами при облучении лимфоцитов протонами в области пика Брэгга, можно рассматривать как пример реакции хромосомного аппарата делящихся клеток опухолевых тканей на воздействие дозы, соответствующей максимуму суммарного пространственного дозного распределения. Как пример: при облучении клеток с семи направлений протонами в области пика Брэгга в суммарной дозе 3 Гр возникает до 90 % клеток с абберациями (рис. 4, кривая 1). При этом в здоровых тканях по ходу протонного пучка с энергией 170 МэВ однократное воздействие сниженной дозы индуцировало бы повреждение не более 10% клеток, а при суммарной дозе 4 Гр  $\sim 15\%$  клеток (рис. 4, кривая 2). Таким образом, при проведении протонной терапии лучевая нагрузка на нормальные ткани по ходу протонного пучка по сравнению с опухолевыми может снижаться почти на порядок величины, по крайней мере, в несколько раз.

Есть основания полагать, что действие протонов терапевтического пучка в области пика Брэгга может быть даже более эффективным. Во-первых, вследствие задержки деления облученных лимфоцитов, при анализе препаратов клеток общепринятым метафазным методом с неизбежностью выпадают наиболее тяжело поврежденные клетки (Lloyd D. C. et al., 1977; Geard C.R., 1980; Collyn-d'Hooghe M. et al., 1981; Lucke-Huhle et al., 1983). Во-вторых, нами отмечено также некоторое повышение уровней эффектов при облучении клеток в S-фазе клеточного цикла по сравнению с неделящимися клетками в G<sub>0</sub>-фазе. В S-фазе как известно, проходит интенсивный синтез ДНК хромосом. Радиационное воздействие приводит к его ингибированию, подавляя инициацию синтеза ДНК (Сынзыныс Б. И. и др., 1987). Как известно, клеткам эукариот свойственен полирепликонный тип репликации ДНК. При этом синтез ДНК проходит асинхронно как между отдельными клетками популяции, так и между отдельными хромосомами и даже в пределах одной хромосомы в клетке. Это способствует реализации возникающих в ДНК повреждений в виде

хромосомных aberrаций. В силу такой асинхронности клеток в S-стадии цикла метафазный метод анализа не позволяет провести строгий количественный учет вклада в суммарный эффект клеток, облученных в этой фазе цикла.

Кроме того, радиочувствительность лимфоцитов была исследована нами только в одной временной точке каждой фазы клеточного цикла. Вместе с тем, радиочувствительность лимфоцитов, как показано многими исследователями, может различаться не только между разными фазами клеточного цикла, но и внутри каждой из них (Севаньяев А. В. и Лучник Н. В., 1967; Джемилев З. А., 1967; Митрофанов Ю. А., 1969; Дубинина Л. Г., 1977; Севаньяев А. В. и др., 1980; Yu C. K. and Sinclair W. K., 1967; Bick Y. A. E. and Brown J. K., 1969).

## **В Ы В О Д Ы**

1. Выявлены количественные и качественные особенности реакции лимфоцитов периферической крови человека на действие протонов терапевтического пучка фазотрона с исходной энергией 170 МэВ и в области пика Брэгга по цитогенетическим показателям.
2. Показана роль физического фактора в реакции клеток человека на действие протонов терапевтического пучка при облучении неделящихся лимфоцитов (в G<sub>0</sub>-фазе клеточного цикла). При оценке по цитогенетическим показателям величина ОБЭ протонов исходного пучка с энергией 170 МэВ близка к 1,0±0,03, протонов в области пика Брэгга – составила ~ 1,2±0,1.
3. По цитогенетическим тестам показано повышение радиочувствительности неделящихся лимфоцитов при облучении протонами терапевтического пучка в области пика Брэгга при прохождении ими фаз клеточного цикла.
4. Выявлена наибольшая радиочувствительность лимфоцитов, облученных в G<sub>2</sub>-фазе клеточного цикла протонами в области пика Брэгга по различным показателям: наиболее продолжительная задержка деления (до 10 ч), высокая частота образования клеток с хромосомными нарушениями и общего числа aberrаций хромосом, резкое увеличение фрагментоза хромосом (до 85% от общего числа aberrаций), высокая частота образования клеток со множественными (≥3) хромосомными aberrациями.
5. Установлены выраженные изменения в соотношениях хромосомных aberrаций разных типов при облучении лимфоцитов в G<sub>0</sub>- и G<sub>2</sub>-фазах клеточного цикла протонами терапевтического пучка в области пика Брэгга: высокий уровень aberrаций хромосомного типа (~75%) с преобладанием обменных aberrаций сменяется преимущественным выходом aberrаций хроматидного типа (~70%) с преобладанием фрагментов.



6. Выявлено влияние биологического фактора в реакции клеток человека на облучение протонами терапевтического пучка в области пика Брэгга вследствие более высокой радиочувствительности делящихся клеток. По сравнению с воздействием протонов-170 МэВ на неделящиеся клетки коэффициент биологической эффективности протонов терапевтического пучка в области пика Брэгга с учетом вклада в эффект фракции радиочувствительных  $G_2$ -облученных лимфоцитов человека составил  $\sim 1,45 \pm 0,10$ .

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Говорун Р.Д., Деперас-Каминьска М., Зайцева Е.М., Мицын Г.В., Молоканов А.Г. Оценка воздействия терапевтического протонного пучка на клетки человека по цитогенетическим нарушениям в лимфоцитах периферической крови человека //Материалы Всеросс. конференции. «Радиобиологические основы лучевой терапии», М. 2005. – С.40.
2. Zaytseva E. M., Govorun R. D. The study of chromosome damages in the human cells irradiated by the therapeutic proton beam //In: Second Int. Conf. “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution”. Yerevan, Armenia. Dubna: JINR, 2005. – P. 294-295.
3. Зайцева Е.М., Деперас-Каминьска М., Говорун Р.Д. Цитогенетические нарушения в клетках человека после воздействия терапевтическим пучком протонов фазотрона //Материалы 12-ой научной конф. студентов, аспирантов и молодых специалистов. Дубна: МУПОЧ «Дубна», 2006. - Ч.1. – С. 80-82.
4. Р.Д.Говорун, М. Деперас-Каминьска, Е.М.Зайцева, Е.А.Красавин, Г.В.Мицын, А.Г.Молоканов. Исследование хромосомных нарушений в клетках человека после облучения терапевтическим пучком протонов фазотрона Объединенного института ядерных исследований //Письма в ЭЧАЯ, 2006. - Т. 3, №1 (130). – С. 92-101.
5. Р.Д.Говорун, Е.М.Зайцева, М. Деперас-Каминьска, Е.А.Красавин, Г. В. Мицын., А.Г.Молоканов. Анализ хромосомных нарушений в клетках человека после облучения терапевтическим пучком протонов фазотрона Объединенного института ядерных исследований //Сборник трудов кафедры биофизики Межд. Университета природы, общества и человека «Дубна», под ред. проф. Е. А. Красавина. М.: РАЕН, 2006. – С. 6-25.
6. Зайцева Е.М., Говорун Р.Д., Красавин Е.А. Культура лимфоцитов крови человека как модель для изучения повреждений клеток опухолей при протонной лучевой терапии //Материалы XV Междунар. научно-практической. конференции. Минск, Беларусь. Экологический вестник, 2007. - № 3. – С. 35-40.

7. Зайцева Е. М. Исследование хромосомных нарушений в клетках человека, облученных терапевтическим пучком протонов //Материалы. VII конф. молодых ученых, специалистов и студентов. М.: ГНЦ РФ-ИМБП РАН, 2008. – С.23.
8. Зайцева Е.М., Говорун Р. Д. Аберрации хромосом в лимфоцитах человека после облучения протонами терапевтического пучка в разных фазах клеточного цикла //Матер. 15-ой научн. конф. студентов, аспирантов и молодых специалистов. Дубна: МУПОЧ «Дубна», 2009.- Ч.1. - С. 124-127.
9. Зайцева Е. М., Говорун Р. Д. Исследование реакции клеток человека на облучение протонами терапевтического пучка //Труды 13-ой научн. конф. молодых ученых и специалистов ОИЯИ. Дубна: ОИЯИ, 2009. – С. 159-162.
10. Zaytseva E. M., Deperas-Kaminska M., Govorun R. D., Deperas-Standylo J., Wojcik A. Comparative analysis of in vitro sensitivity of human lymphocytes exposed to radiation of different LET // Fifth international Summer School on Nuclear Physics Methods and Accelerators in Biology and Medicine. Bratislava, Slovak Rep., 2009. Melville, New York: AIP conference proceedings. 2009. Vol. 1204. – P. 239-240.
11. Zaytseva E. M., Deperas-Kaminska M., Govorun R. D., Kutsalo P. V., Deperas-Standylo J., Mitsyn G. V., Molokanov A. G., Gaevsky V. N., Wojcik A. Comparison of the in vitro sensitivity of human lymphocytes exposed to gamma rays and protons // 37th Annual Meeting of the European Radiation Research Society. Prague, Czech Rep., 2009. – P. 145.
12. Говорун Р. Д., Зайцева Е. М., Красавин Е. А., Мицын Г. В., Молоканов А. Г. Оценка эффективности облучения клеток человека протонами терапевтического пучка фазотрона ОИЯИ по цитогенетическим методам //Материалы VI Съезда по радиационным исследованиям. М.: РУДН, 2010. - Т. 2. – С 123.
13. Зайцева Е. М., Говорун Р. Д., Мицын Г. В., Молоканов А. Г. Оценка цитогенетическими методами эффективности облучения клеток человека протонами терапевтического пучка фазотрона ОИЯИ //Письма в ЭЧАЯ, 2011. - Т. 8. № 6 (169). – С. 996-1006.
14. Зайцева Е. М., Говорун Р. Д., Мицын Г. В., Молоканов А. Г. Оценка эффективности воздействия протонами терапевтического пучка фазотрона ОИЯИ на клетки человека по цитогенетическим тестам // Материалы Российской. научной конференции с международным участием «Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии». Санкт-Петербург, 2011. – С. 131.