

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ^{12}C И ^{60}Co НА КЛЕТКИ ГЕПАТОКАРЦИНОМЫ

Мельникова А.А., Балдов Д.А., Комарова Л.Н.

*Обнинский институт атомной энергетики — филиал федерального
государственного автономного образовательного учреждения высшего образования
«Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», тер. Студгородок, д.1,
г. Обнинск, Россия, 249039*

Резюме. Введение. Комбинированное действие ионизирующего излучения и противоопухолевых препаратов часто применяется для повышения радиочувствительности злокачественных клеток при лечении резистентных форм онкологических заболеваний. Согласно данным ВОЗ одним из трудноизлечимых онкологических заболеваний является рак печени из-за происходящих цирротических изменений органа. В схему лечения пациентов с опухолями такой локализации входят резекция, химиотерапия, таргетная терапия. Текущее радиобиологическое исследование основано на концепции синергизма, предложенной В. Г. Петиным и В. П. Комаровым для описания эффектов комбинированного действия ионизирующего излучения и модифицирующих агентов на выживаемость клеточных культур. *Цель.* Оценка эффектов комбинированного действия ^{12}C и ^{60}Co с цитостатическим препаратом на клетках HUH-7. *Материалы и методы.* В качестве объектов исследования были выбраны клеточные линии HUH-7, НЕК-293. Одним из факторов воздействия являлся антрациклиновый антибиотик доксорубин. Клетки облучали ионами ^{12}C на синхротроне У-70, а также ^{60}Co на Уникальной исследовательской установке ФГБНУ ВНИИРАЭ радиационного облучения «ГУР-120». Пострадиационное культивирование клеток заключалось в проведении клоногенного анализа, времени удвоения с последующей оценкой коэффициента синергизма. *Результаты.* По результатам экспериментальной работы установлена относительная биологическая эффективность действия ионов ^{12}C при однократном облучении нормальных и раковых клетках. Нами показано, что при комбинированном действии плотноионизирующего излучения и доксорубина наблюдается синергическое взаимодействие. *Заключение.* Получены экспериментальные данные о проявлении синергического характера применяемых агентов на клетках гепатокарциномы HUH-7.

Ключевые слова: плотноионизирующее излучение; химиопрепарат; эффект синергизма; гепатокарцинома; гамма-излучение; ионы углерода.

**EXPERIMENTAL RESEARCH OF THE BIOLOGICAL EFFECT OF ^{12}C AND ^{60}C
IONS ON HEPATOCARCINOMA CELLS**

Melnikova A.A., Baldov D.A., Komarova L.N.

Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, NRNU MEPhI,

1 Studgorodok, 249040 Obninsk, Kaluga Reg., Russia

Abstract. The combined effect of ionizing radiation and antitumor drugs is often used to increase the radiosensitivity of malignant cells in the treatment of resistant forms of cancer. According to WHO, one of the intractable oncological diseases is liver cancer due to the ongoing cirrhotic changes. The treatment regimen for patients with tumors of this localization includes resection, chemotherapy, targeted therapy. The current radiobiological study is based on the concept of synergy proposed by V. G. Petin and V. P. to describe the effects of the combined action of ionizing radiation and modifying agents on the survival of cell cultures. **Aim.** Evaluation of the effects of the combined action of ^{12}C and ^{60}C with a cytostatic drug on HUH-7 cells. **Materials and methods.** The cell lines HUH-7, HEK-293 were selected as the objects of the study. One of the impact factors was the anthracycline antibiotic doxorubicin. The cells were irradiated with ^{12}C ions on the synchrotron U-70, as well as ^{60}Co on the Unique Research Facility of the FSBI VNIIRAE radiation Irradiation "GUR-120". The radiation cultivation of cells consisted in carrying out a clonogenic analysis, doubling time, followed by an assessment of the synergism coefficient. **Results.** According to the results of experimental work, the relative biological effectiveness of the action of ^{12}C ions with a single irradiation of normal and cancer cells was established. We have shown that a synergistic interaction is observed with the combined action of dense ionizing radiation and doxorubicin. **Conclusions.** Experimental data on the manifestation of the synergistic nature of the agents used on the cells of hepatocarcinoma HUH-7 were obtained.

Key words: densely ionizing irradiation; chemotherapy drug; synergistic effect; hepatocarcinoma; gamma radiation; carbon ions.

Введение. Согласно данным [1] показатель выявления злокачественных опухолей в России за 2021 г. вырос на 4,4% по сравнению с 2020 г. и составил 580 415 случаев. Одним из лидирующих заболеваний остается гепатоцеллюлярный рак, причем метастазы в печени при злокачественных новообразованиях других органов встречаются примерно в 30 раз чаще, чем первичный рак. В схему лечения пациентов с опухолями печени задействован комплексный подход, включающий хирургическое вмешательство, химиотерапию, радиотерапию, иммунотерапию.

Одним из важнейших методов лечения является лучевая терапия (ЛТ). Основанием неэффективности ЛТ с применением редкоионизирующего излучения (фотоны и электроны) при глубокорасположенных и радиорезистентных опухолях является неспособность излучения проникнуть на заданную глубину. По этой причине возникает стремление к максимальной прецизионности с одновременным подходом к сокращению курсов высокодозного облучения. В виду меньшего уровня облучения нормальных тканей перспективным направлением является терапия протонными и углеродными пучками.

Впервые упоминание о возможном использовании ускоренных протонов и тяжелых ядер для лечения злокачественных новообразований, опубликованное в журнале «Радиология» в 1946 г., было сделано Робертом Вильсоном [2].

На сегодняшний день тяжелые заряженные частицы (ТЗЧ) все чаще применяются в области клинической радиологии. ТЗЧ проходят через вещество, расходуя кинетическую энергию на ионизацию атомов. Поглощенная доза в веществе имеет форму кривой, называемой кривой Брэгга и с глубиной возрастает, достигая пика, а затем падая до нуля [3,4].

Существенным недостатком использования ТЗЧ является их фрагментация на осколки, имеющие большую длину пробега по сравнению с первичными ионами, что приводит к возрастанию дозы, которую получают здоровые ткани. С увеличением глубины количество осколков деления возрастает, достигая максимума вблизи пика Брэгга. Затем количество осколков падает, так как все ионы остановились и не могут производить новые [5]. Для ионов углерода осколками являются ионы бора, бериллия, лития, гелия [6, 7].

Также, одним из методов преодоления резистентности опухолевых клеток является высокодозная химиотерапия. В текущем исследовании мы использовали доксорубин – противоопухолевый антибиотик, оказывающий антимитотическое и антипролиферативное действие. Известен как представитель сильнодействующего класса препаратов для химиотерапии. Применяется для лечения злокачественных опухолей печени, желудка, поджелудочной железы, легких, молочной железы, шейки матки, яичников и гематологических новообразований и др.

В области экспериментальной и медицинской радиологии перспективным является поиск методов лечения опухолевых заболеваний. Актуальность нашего исследования заключалась в проведении серии экспериментов по изучению биологических эффектов действия ионизирующего излучения (ИИ) разного качества в комбинации с противоопухолевым препаратом на клетках различного происхождения *in vitro*.

Объектами исследования являлись клеточные линии HUH-7 (гепатокарцинома), НЕК-293 (клетки эмбриональной почки человека).

Цель исследования. Изучение биологических эффектов плотоионизирующего и редкоионизирующего излучения в комбинации с доксорубицином на клетках различного генеза *in vitro*.

Материалы и методы. Выбор препарата доксорубицин (Doxorubicin) обусловлен широким спектром действия в отношении многих опухолей по сравнению с такими препаратами как: паклитаксел (Paclitaxel), цисплатин (Cisplatin), капецитабин (Capecitabine), эпирубицин (Epirubicin).

Линии клеток HUH-7 и НЕК-293 культивировали в питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением следующих компонентов: 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, USA), пенициллин/стрептомицин («ПанЭко», Россия) и глютамин (292 мг/л) («ПанЭко», Россия). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 5% содержании CO₂ и 37°C до достижения лог-фазы.

Были сформированы следующие экспериментальные группы: часть клеток, подвергшаяся только воздействию ионизирующего излучения; часть клеток, на которую действовали облучение и химиопрепарат; следующую группу клеток инкубировали только с препаратом. В качестве контроля рассматривались клетки, не подвергавшиеся облучению и не обработанные препаратом.

Перед началом облучения клетки инкубировали с препаратом доксорубицин (Докс) в дозе 0,004 мг/мл [8, 9, 10] в течение 24 ч, затем облучали. Клетки в логарифмической фазе роста обрабатывали раствором трипсина и версена в отношении 1:1. Полученную суспензию разводили до нужной концентрации (до 50 тыс. кл/мл) в пробирках типа Эппендорф.

Облучение на ускорителе ионов У-70 осуществлялось в водном фантоме со средней энергией 450 МэВ/ нуклон на синхротроне У-70 Института физики высоких энергий (ИФВЭ) ФГБУ ГНЦ РФ «Курчатовский институт» (г. Протвино). Средняя ЛПЭ излучения на начальном участке составила 11 кэВ/мкм, в пике 120-140 кэВ/мкм. Доза облучения опухолевых клеток в пике Брэгга составила 1, 2, 4 Гр. Облучение нормальных клеток линии НЕК-293 происходило в хвосте пика Брэгга в дозе 1 и 4 Гр.

Облучение на гамма-установке «ГУР-120». Источником ионизирующего излучения ⁶⁰Со, E_{ср} = 1,25 МэВ являлась Уникальная исследовательская установка ФГБНУ ВНИИРАЭ радиационного облучения «ГУР-120». Мощность дозы составила 0,9 Гр/мин при дозах облучения: 1, 2, 4, 6 Гр для злокачественных и нормальных клеток. Гамма-излучение действовало дополнительно в дозе 6 Гр в виду большей биологической эффективности ионов углерода.

Оценка ОБЭ. Ключевым параметром для характеристики биологического действия ионизирующего излучения является понятие относительной биологической эффективности (ОБЭ). В качестве эталонного применяется γ -излучение.

ОБЭ является количественным показателем качества ионизирующего излучения и определяется как [11]:

$$\text{ОБЭ} = \frac{D_{\text{станд.}}}{D_{\text{иссл.}}} \quad (1)$$

где $D_{\text{иссл.}}$ – поглощенная доза излучения, при котором наблюдается биологический эффект, а $D_{\text{станд.}}$ – поглощенная доза, вызывающая тот же биологический эффект при воздействии стандартного излучения, в качестве которого выступает γ -излучение.

Клоногенный анализ. Данная методика широко применяется при оценке эффективности лекарственных средств или других агентов на рост и пролиферацию клеток [12, 13]. Суть метода заключается в посеве клеток с их последующей инкубацией на протяжении 10-14 дней. После формирования колоний, содержащих не менее 50 клеток, питательную среду удаляли и окрашивали колонии 2%-ным раствором метиленового синего [14].

Время удвоения. Под временем удвоения подразумевается период времени, соответствующий логарифмической фазе роста, в течение которого количество клеток в популяции возрастет вдвое. Мы вносили клетки в концентрации 10 000 клеток на чашку Петри. После культивирования в течение 48 часов клетки снимали раствором Трипсина-Версена и подсчитывали в камере Горяева. Формула расчета времени удвоения T_D :

$$TD = tp \times \frac{\log 2}{\log(\frac{N_2}{N_1})}, \quad (2)$$

где T_D – время культивирования клеток, N_1 – начальное и N_2 – конечное количество клеток.

Количественная оценка синергизма. В нашей работе для описания эффективности взаимодействия ИИ и Докс мы применили концепцию синергизма [15]. Согласно положениям данной концепции суммарное число повреждений, образуемых при независимом действии двух факторов, определяется суммой повреждений, образованных каждым из действующих факторов.

Итоговая количественная оценка синергического эффекта проводилась с использованием коэффициента синергического усиления k , рассчитанного по формуле:

$$k = \frac{t_2}{t_1} = \frac{D_2}{D_1} \quad (3)$$

Таким образом, коэффициент синергического усиления (КСУ) определяется отношением теоретически ожидаемой выживаемости клеток при независимом сложении эффектов от обоих агентов, к соответствующей выживаемости, оцененной по экспериментальной кривой выживаемости, полученной после комбинированного действия [16].

Результаты и их обсуждение. На начальном этапе исследования дана сравнительная оценка выживаемости клеточных линий после действия ИИ разного качества. На рисунке 1 представлен график зависимости выживаемости опухолевых клеток линии HUN-7 от дозы излучения. Кривая 1 отображает действие гамма-излучения, кривая 2 – действие адронного излучения ^{12}C .

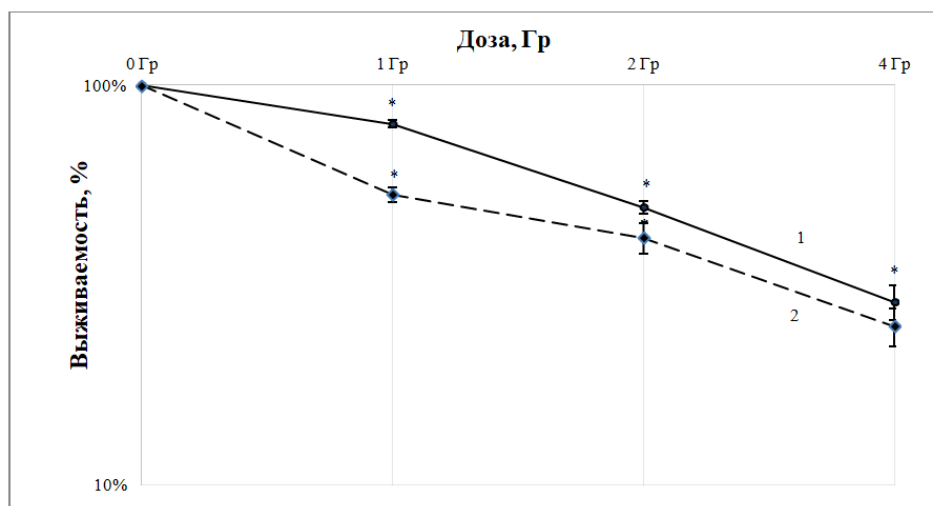


Рисунок 1 - Зависимость выживаемости клеток HUN-7 от дозы ИИ

Согласно полученным данным, как и ожидалось, выживаемость опухолевых клеток ниже при плотноионизирующем излучении, чем при действии редкоионизирующего.

Значение ОБЭ было рассчитано с использованием формулы (1) и для ионного излучения ^{12}C для клеточной линии HUN-7 составило $2 \pm 0,1$.

Далее мы проводили облучение клеток НЕК-293, так как вследствие формирования осколков деления с большой длиной пробега за пиком Брэгга возникает возможность нанесения повреждений нормальным клеткам, находящимся за опухолью. Принимая во внимание этот факт, облучение нормальных клеток НЕК-293 на ускорителе ионов У-70 проводилось в хвосте пика Брэгга в дозах 1 и 4 Гр. Сравнение эффективности рассматриваемых видов излучений представляется возможным в дозах 1 и 4 Гр, что представлено на рисунке 2.

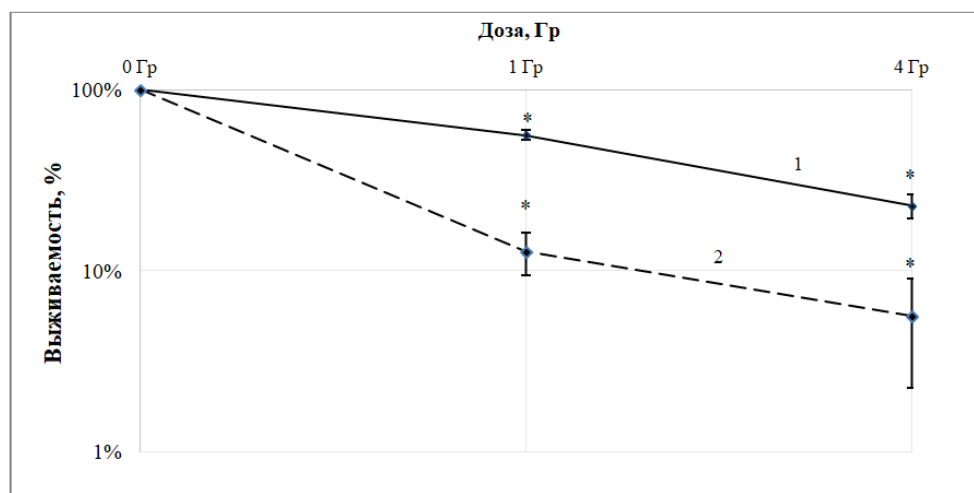


Рисунок 2 - Зависимость выживаемости клеток НЕК-293 от дозы ионизирующего излучения

Рисунок 2 отображает дозовую зависимость выживаемости неопухолевых клеток. Результаты свидетельствуют о высокой эффективности ^{12}C по сравнению с гамма-излучением. Для клеток почки человека НЕК-293 показатель ОБЭ за пиком Брэгга составил $2,8 \pm 0,2$.

Для дальнейшего изучения биологических эффектов мы рассчитывали время удвоения клеток для всех четырех групп исследования (рисунок 3).

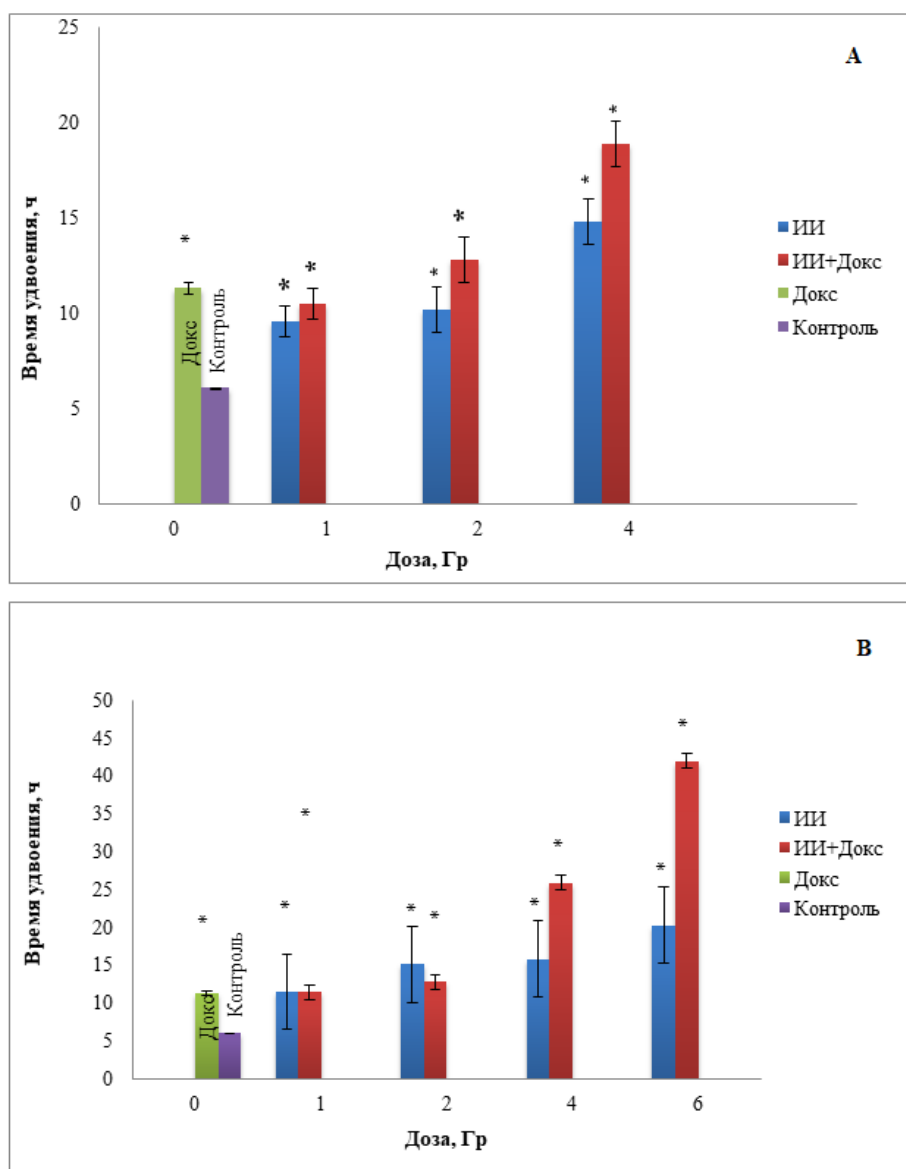


Рисунок 3 - Зависимость времени удвоения HUN-7 от дозы облучения:

А – ионы ^{12}C , В – гамма-излучение

Мы наблюдаем наиболее длительный показатель времени удвоения при комбинированном действии излучения и Докс. Эти результаты предполагают, что повышенная радиочувствительность опухолевых клеток к излучению обусловлена первоначальным действием противоопухолевого препарата.

Далее мы оценивали эффективность излучения разного качества по кривым выживаемости клеток HUN-7 после комбинированного действия излучения разного качества и доксорубина (рисунок 4). На рисунке 4 кривая 1 характеризует действие ионизирующего излучения, точкой 2 отмечено действие доксорубина, кривая 3 – теоретическая кривая, ожидаемая при независимом сложении эффектов от ионизирующего излучения и

доксорубицина, кривая 4 – выживаемость клеток после комбинированного действия ионизирующего излучения и химиопрепарата.

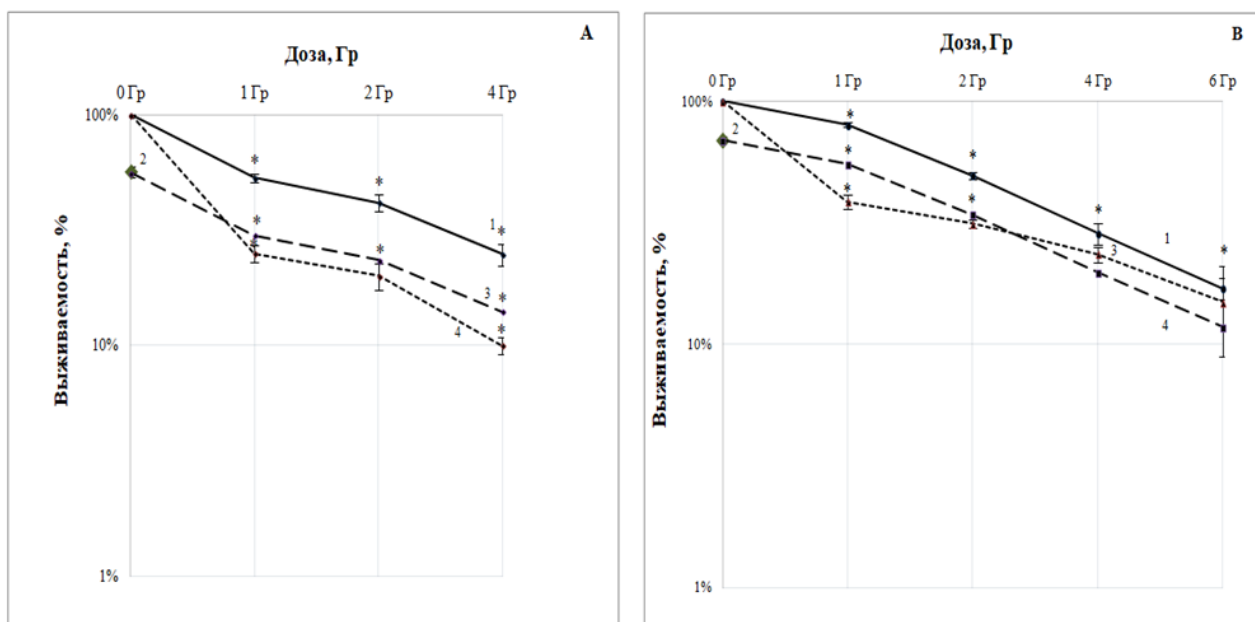


Рисунок 4 - Зависимость выживаемости клеток HUH-7 от дозы (ионы углерода): А – ионы ^{12}C , В – гамма-излучение

В ходе количественной оценки синергизма, согласно рассматриваемой концепции, полученная экспериментальная кривая 4 проходит ниже теоретически ожидаемой кривой, что свидетельствует о более высокой гибели опухолевых клеток после комбинированного действия двух агентов по сравнению с аддитивным действием ионизирующего излучения и химиопрепарата. В таком случае при действии Докс и плотноионизирующего излучения в дозе 4 Гр наименьший показатель выживаемости клеток гепатокарциномы составляет 6%. Мы можем объяснить этот факт тем, что при действии Докс клетка накапливает не летальные субповреждения, что приводит к повышению радиочувствительности к ионизирующему излучению.

Результаты изменения коэффициента синергизма для излучения разного качества с применением формулы (3) представлены в таблице.

Коэффициент синергизма для клеток гепатокарциномы

Ионизирующее излучение	Выживаемость	КСУ
Ионы ^{12}C	Уровень 30%	$1,02 \pm 0,02$
	Уровень 15%	$1,46 \pm 0,12$
Гамма-излучение	Уровень 65%	$0,26 \pm 0,02$
	Уровень 35 %	$1,22 \pm 0,01$

Полученные значения КСУ подтверждают проявления синергизма при действии плотноионизирующего излучения в комбинации с доксорубицином и возрастают с дозой облучения. В публикации [7] рассматривается предположение, что при комбинированном действии подавление восстановления обусловлено причиной усиления двух рассматриваемых факторов.

Для дальнейшего изучения результатов, полученных при построении кривых зависимости выживаемости, была построена зависимость КСУ от дозы ионизирующего излучения (рисунок 5).

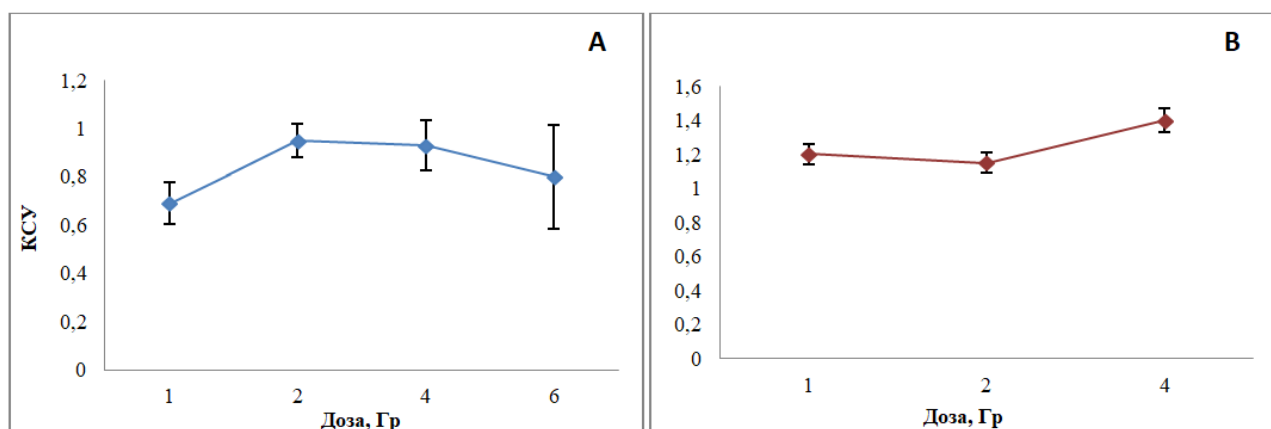


Рисунок 5 - Зависимость КСУ от дозы ионизирующего излучения:

А - гамма-излучение, В - ионы ^{12}C

Данные текущего исследования показывают, что эффект синергизма проявляется с увеличением дозы редкоионизирующего излучения. Согласно математической модели синергизма, максимальное взаимодействие достигается при равенстве субповреждений, которые формируют каждый из исследуемых факторов [15].

Заключение. Основной целью текущего исследования являлась оценка эффектов комбинированного действия ^{12}C и ^{60}Co с цитостатическим препаратом на клетках HUN-7. В рамках текущей работы были выявлены закономерности синергического взаимодействия плотно- и редкоионизирующего излучений с Докс на клетках человека различного генеза *in vitro*. В ходе исследования установлена относительная биологическая эффективность действия ионов ^{12}C при однократном облучении на нормальных и опухолевых клетках, значение ОБЭ за пиком Брэгга составили 2,8 для НЕК-293, значение ОБЭ в пике Брэгга для HUN-7 – 2. Продемонстрировано, что при комбинированном действии ионов ^{12}C и доксорубина наблюдается синергическое взаимодействие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2022.
2. Wilson R.R. Radiological use of fast protons. *Radiology*. 1946; 47: 487- 491.
3. Durante M., Loeffler J.S. Charged particles in radiation oncology. *Nat Rev Clin. Oncol*. 2010; 7(1): 37- 43.
4. Лосев Д.В., Ломанов М.Ф., Черняев А. П. Аналитический расчет модифицированной кривой Брэгга. Препринт НИИЯФ МГУ. 2003.
5. Johnson D., Chen Y., Ahmad S. Dose and linear energy transfer distributions of primary and secondary particles in carbon ion radiation therapy: A Monte Carlo simulation study in water. *Med Phys*. 2015; 40: 214-219.
6. Haettner E., Iwase H., Schardt D. Experimental fragmentation studies with ^{12}C therapy beams. *Radiation Protection Dosimetry*. 2006; 122(14): 485-487.
7. Hall E.J., Giaccia A.J. Radiobiology for the Radiologist. Chapters 17, 27, 28. 8th ed. PA: Wolters Kluwer. 2018.
8. Алясова А.В., Ведунова М.В., Мищенко Т.А. и др. Влияние озона и доксорубина на жизнеспособность и морфологию злокачественных клеток печени. *Современные технологии в медицине*. 2016; 8 (2): 84- 89.
9. Бакина О.В., Сваровская Н.В., Миллер А.А. и др. Синергетический эффект противоопухолевой активности доксорубина и бикомпонентных наноструктур на основе оксида алюминия. *Сибирский онкологический журнал*. 2020; 19(2): 82- 89.
10. Конторщикова К.Н., Ведунова М.В., Макарова Е.С. и др. Влияние доксорубина, озона и кислорода на жизнеспособность нормальных и злокачественных клеток печени в культуре. *Биорадикалы и Антиоксиданты*. 2016; 3(1): 15-17.

11. Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А. Радиобиология человека и животных: учебник / С. П. Ярмоненко. М.: Высшая школа; 2004.
12. Бекман И.Н. Радиационная и ядерная медицина: физические и химические аспекты: учеб. пособие / И. Н. Бекман. МО, Щелково: Издатель П. Ю. Мархотин; 2012.
13. Касатов Д.А. Излучение при поглощении 2 МэВ протонов в различных материалах. *Ядерная физика*. 2015; 78(11): 963- 969.
14. Guda K., Natale L., Markowitz S. An improved method for staining cell colonies in clonogenic assays. *Cytotechnology*. 2007;54: 85- 88.
15. Белкина С.В. Комарова Л.Н., Крицкий Р.О. Прогнозирование синергических эффектов ионизирующего излучения и других повреждающих факторов на клетки млекопитающих и растения. *Радиация и риск*. 2006; 15; 3- 4: 120- 132.
16. Петин В.Г., Жураковская Г.П., Комарова Л.Н. Радиобиологические основы синергических взаимодействий в биосфере. Москва: ГЕОС; 2012.

References

1. The state of oncological care to the population of Russia in 2021 / edited by A D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova. M.: P.A. Herzen Institute of Oncology – branch of the Federal State Budgetary Institution "NMIC of Radiology" of the Ministry of Health of Russia; 2022: 239 (in Russian).
2. Wilson R.R. Radiological use of fast protons. *Radiology*. 1946;47: 487-491.
3. Durante M., Loeffler J.S. Charged particles in radiation oncology. *Nat Rev Clin. Oncol*. 2010; 7(1): 37-43.
4. Losev D.V., Lomanov M.F., Chernyaev A.P. Analytical calculation of the modified Bragg curve. *MSU NIIYAF Preprint*. 2003; 16 (in Russian).
5. Johnson D., Chen Y., Ahmad S. Dose and linear energy transfer distributions of primary and secondary particles in carbon ion radiation therapy: A Monte Carlo simulation study in water. *Med Phys*. 2015; 40: 214-219.
6. Haettner E., Iwase H., Schardt D. Experimental fragmentation studies with 12C therapy beams. *Radiation Protection Dosimetry*. 2006; 122(14): 485-487.
7. Hall E.J., Giaccia A.J. Radiobiology for the Radiologist. Chapters 17, 27, 28. 8th ed. PA: Wolters Kluwer. 2018.
8. Alyasova A.V., Vedunova M.V., Mishchenko T.A. and others. The effect of ozone and doxorubicin on the viability and morphology of malignant liver cells. *Modern technologies in medicine*. 2016; 8 (2): 84-89 (in Russian).

9. Bakina O.V., Swarovskaya N.V., Miller A.A. et al.. Synergistic effect of antitumor activity of doxorubicin and bicomponent nanostructures based on aluminum oxide. *Siberian Journal of Oncology*. 2020; 19(2): 82-89 (in Russian).
10. Kontorshchikova K.N., Vedunova M.V., Makarova E.S. et al. The effect of doxorubicin, ozone and oxygen on the viability of normal and malignant liver cells in culture. *Radicals and Antioxidants*. 2016; 3(1): 15-17 (in Russian).
11. Yarmonenko S.P., Vainson A.A. Radiobiology of man and animals: textbook / S. P. Yarmonenko. M.: Higher School; 2004. (in Russian).
12. Bekman I.N. Radiation and nuclear medicine: physical and chemical aspects: textbook. Manual. 2012. (in Russian).
13. Kasatov D.A. Radiation during the absorption of 2 MeV protons in various materials. *Nuclear physics*. 2015; 78(11): 963-969. (in Russian)
14. Guda K., Natale L., Markowitz S. An improved method for staining cell colonies in clonogenic assays. *Cytotechnology*. 2007;54: 85-88.
15. Belkina S.V. Komarova L.N., Kritsky R.O. Prediction of synergistic effects of ionizing radiation and other damaging factors on mammalian and plant cells. *Radiation and risk*. 2006; 15; 3-4: 120-132. (in Russian)
16. Petin V.G., Zhurakovskaya G.P., Komarova L.N. Radiobiological foundations of synergistic interactions in the biosphere. Moscow: GEOS; 2012. (in Russian).