

УДК 615.849.114

# Уникальный прототип радиотерапевтической установки: р53-независимый антипролиферативный эффект нейтронного облучения

Д. И. Юрков<sup>1</sup>, С. В. Сыромуков<sup>1</sup>, В. В. Татарский<sup>2,3</sup>, Е. С. Иванова<sup>2</sup>, А. И. Хамидуллина<sup>3</sup>, М. А. Ястребова<sup>3</sup>, В. И. Сысоев<sup>1</sup>, Р. В. Добров<sup>1</sup>, А. В. Белоусов<sup>4,5</sup>, В. Н. Морозов<sup>1,4</sup>, М. А. Колыванова<sup>4</sup>, Г. А. Крусанов<sup>4,6</sup>, В. И. Зверев<sup>1,5</sup>, А. А. Штиль<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт автоматики им. Н.Л. Духова, 127055, Москва, Суцевская ул., 22

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, 115478, Москва, Каширское ш., 24

<sup>3</sup>Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

<sup>4</sup>Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123098, Москва, ул. Маршала Новикова, 23

<sup>5</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

<sup>6</sup>НИИ ядерной физики им. Д.В. Скобельцина при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

\*E-mail: shtilaa@yahoo.com

Поступило в редакцию 09.04.2019

Принято к печати 18.06.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-99-102

**РЕФЕРАТ** Лучевая терапия с использованием тяжелых частиц (в частности, нейтронов) предусматривает создание нового оборудования. Для замены применяемых в настоящее время ядерных реакторов, циклотронов и линейных ускорителей сконструирован компактный, переносной и мощный генератор нейтронов НГ-24 (вес 140 кг, размеры 42 × 110 см, мощность потока частиц  $10^{11}$  н/с, энергия ~ 14 МэВ). Облучение нейтронами, генерируемыми НГ-24, вызывало выраженный антипролиферативный эффект на культурах опухолевых клеток человека независимо от статуса проапоптотического белка р53. Фосфорилирование гистона 2А и увеличение количества белков р21, циклина D и фосфорилированного р53 выявлены в клетках линии НСТ116 рака толстой кишки (интактный р53), облученных в дозе 4 Гр. Облучение приводило к задержке клеточного цикла в фазе G2/M. Способность клеток к колониеобразованию существенно снижалась. В сублинии НСТ116р53КО (нокаут р53) задержка в G2/M оказалась не связанной с указанными молекулярными событиями. Таким образом, НГ-24 – прототип клинически приемлемого источника высокоэнергетических нейтронов, вызывающих противоопухолевые эффекты в терапевтических дозах.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** быстрые нейтроны, генераторы нейтронов, опухолевые клетки, повреждения ДНК, гибель клеток.

## ВВЕДЕНИЕ

В традиционной лучевой терапии опухолей используются источники фотонов с энергией 30 кэВ–25 МэВ. Однако по эффективности фотоны уступают тяжелым частицам, в частности, нейтронам с энергией > 1 МэВ («быстрые» нейтроны). Благодаря высоким значениям линейной передачи энергии и относительной биологической эффективности (ОБЭ) быстрые нейтроны имеют преимущество перед

фотонами в терапии радиорезистентных опухолей [1]. Несмотря на терапевтическую перспективность, клиническое применение нейтронов ограничено, в том числе из-за особенностей приборного обеспечения. Используемые в международной практике циклотроны, ядерные реакторы и линейные ускорители [1, 2] представляют собой громоздкие, сложные в управлении и обслуживании стационарные устройства.

Альтернативным подходом может быть использование малогабаритных источников быстрых нейтронов. Генератор НГ-24, разработанный во ВНИИА им. Н.Л. Духова – компактное, переносное и безопасное устройство с достаточной терапевтической мощностью [3]. Технические параметры НГ-24 представлены в *таблице*. Небольшие габариты НГ-24 позволяют поместить его как на гантри, так и на роботизированном манипуляторе. Источником нейтронов в НГ-24 является насыщенная тритием мишень, на которую направляется пучок ионов дейтерия, ускоренных в электрическом поле. В результате ядерной реакции  ${}^3\text{H}(d,n){}^4\text{He}$  генерируются нейтроны с энергиями 14–15 МэВ. При широком сечении реакции (5 барн при 107 кэВ) может быть получен поток  $> 10^{11}$  нейтронов/с. [4, 5]. Теоретические расчеты и эксперименты показали близкую к линейной зависимость энергии нейтронов (14.71–14.87 МэВ) от ускоряющего напряжения [6, 7].

#### Параметры НГ-24

|                                 |                          |
|---------------------------------|--------------------------|
| Поток, нейтронов/с              | $\sim 1 \times 10^{11}$  |
| Энергия нейтронов, МэВ          | $> 14$                   |
| Ресурсное время, ч              | 500                      |
| Размеры, мм                     | 420 × 1100               |
| Масса, кг                       | 140                      |
| Электрическое питание, мощность | 50/60 Гц, 220 В, 1200 Вт |

В настоящей работе исследована способность нейтронного пучка, генерируемого НГ-24, вызывать терапевтически важные эффекты на моделях культивируемых опухолевых клеток человека.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поглощенную дозу в монослое клеток оценивали по потоку частиц методом компьютерного моделирования в программном коде Geant4 [8] (Physicslist QGSP\_BIC\_HP для нейтронов с энергией  $< 20$  МэВ). Рассчитанный коэффициент конверсии потока частиц в дозу, поглощенную слоем опухолевых клеток, равен  $5.7 \times 10^{-13}$  Гр/нейтрон. Негомогенность потока нейтронов в монослое клеток не превышала  $\pm 15\%$ .

Реактивы получены в компании «ПанЭко» (Россия), кроме особо оговоренных случаев. Линии клеток рака толстой кишки НСТ116 (интактный p53) и молочной железы MCF7 (делеция каспазы 3) человека получены из Американской коллекции тканевых культур. Сублиния НСТ116p53КО с нефункционирующим белком p53 получена в лаборатории Б. Фогелстайна [9]. Клетки (50% монослоя) в 25 см<sup>2</sup> флаконах облучали 14 МэВ нейтронами. Для колониеобразования 1000 облученных и необлученных (контроль) клеток рассевали на 100-мм чашку Петри в 20 мл модифицированной Дульбекко сре-

ды Игла с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США), 2 mM L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, инкубировали в течение 14 сут при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Колонии фиксировали метанолом и окрашивали метиловым фиолетовым. Для проточной цитофлуориметрии и иммуноблотинга облученные клетки инкубировали в указанной среде в течение 1–4 сут. Протоколы исследования клеточного цикла и белков опубликованы нами ранее [10–12]. Антитела приобретены в компании Cell Signaling (США).

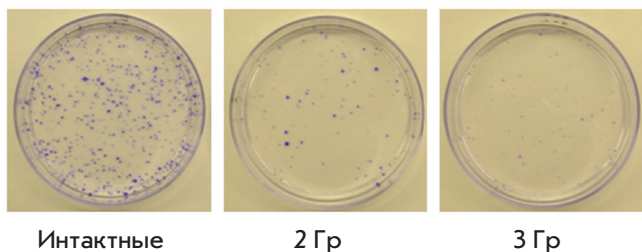
#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Однократное облучение линии НСТ116 в дозе 2 Гр значительно снижало способность клеток к пролиферации; после подведения дозы 3 Гр насчитывали лишь единичные мелкие ( $\leq 6$  клеток) колонии (*рисунок А*). Через 2 сут после облучения клетки накапливались в фазе G2/M. Эта задержка сохранялась не менее 4 сут (*рисунок Б*; отметим увеличение доли полиплоидных клеток – признак нарушения митоза). Полученные результаты указывают на повреждение целостности ДНК как основной механизм ответа клеток на облучение нейтронами, генерируемыми НГ-24. Действительно, через 4 ч доля клеток с фосфорилированным гистоном H2A – маркером разрывов ДНК – возрастала с 10% в интактных клетках до  $> 70\%$  в клетках, получивших дозу 4 Гр. Этот эффект сохранялся не менее 24 ч после воздействия нейтронов.

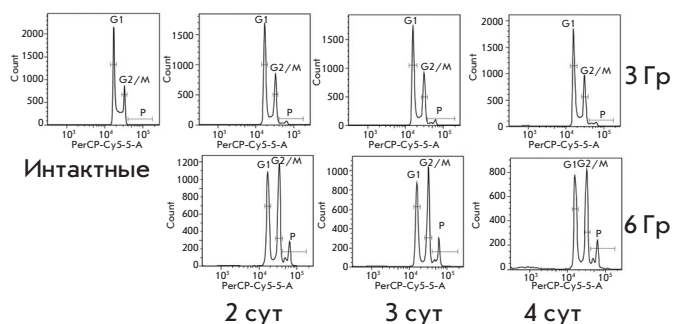
Важно, что эффекты нейтронного облучения, выявленные на линии НСТ116, воспроизводятся на изогенной сублинии НСТ116p53КО. Эта сублиния с инактивированным проапоптотическим белком p53 устойчива к ряду ДНК-повреждающих противоопухолевых препаратов [10]. Следовательно, p53 не обязателен для антипролиферативного действия нейтронов. Описанные эффекты наблюдали и для линии рака молочной железы MCF7 (делеция каспазы 3). Таким образом, противоопухолевые эффекты нейтронного облучения выявляются в клетках разного тканевого происхождения; отдельные нефункционирующие механизмы гибели, в других ситуациях ограничивающие терапевтическую эффективность, не препятствуют реализации противоопухолевого действия нейтронов.

Несмотря на схожесть ответа на облучение нейтронами, молекулярные события в клетках с интактным и нефункционирующим p53 не одинаковы. Так, накопление белка p21, тормозящего смену фаз клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК, а также активация циклина D1 – драйвера перехода G1-S – выявлены только в клетках НСТ116, но не в сублинии НСТ116p53КО (4 Гр; *рисунок В*). Поэтому увели-

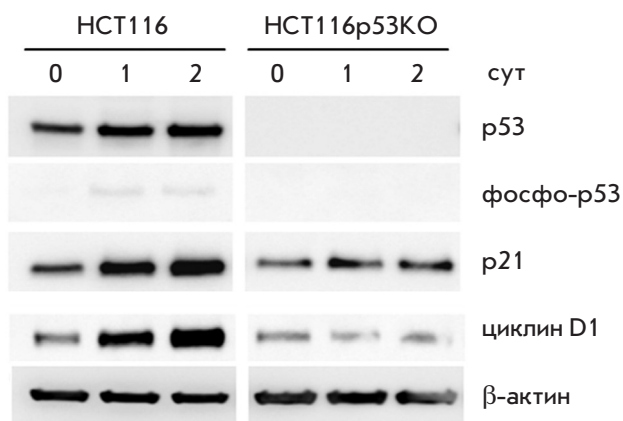
A



Б



В



Молекулярные механизмы ответа клеток НСТ116 и НСТ116р53КО на облучение быстрыми нейтронами. А – колониобразование; Б – распределение фаз клеточного цикла (проточная цитофлуориметрия, Р – полиплоидные ядра); В – иммуноблоттинг. Показаны репрезентативные результаты (не менее трех повторностей)

чение p53, p21 и циклина D1 приводило к задержке клеток НСТ116 в фазе G2/M, тогда как при нефункционирующем p53 такое же нарушение клеточного цикла обусловлено другими механизмами. Предстоит установить эти механизмы, а также выявить окончательный результат нейтронного облучения – апоптоз, митотическая катастрофа, старение и др.

Таким образом, генератор НГ-24 создает поток нейтронов, достаточный для индукции молекуляр-

ных и фенотипических нарушений в дозах и интервалах времени, соответствующих принятым в лучевой терапии, что позволяет предполагать пригодность установки для терапевтических задач. В то же время нейтронное излучение требует особых подходов к обеспечению безопасности пациента.

Важнейшим является вопрос о повреждении нейтронами неопухолевых клеток. Учитывая зависимость противоопухолевой эффективности от параметров облучения, недостаточность информации о биологических закономерностях действия нейтронов, а также сложность точного определения поглощенной дозы нейтронного излучения, построение корреляций на основании сравнения ответа линий опухолевых и неопухолевых клеток представляется малопродуктивным. Экспериментальное исследование осложняется невозможностью образования колоний нетрансформированными клетками и трудностями длительного культивирования, что требует систематического исследования.

Конформность нейтронного облучения обеспечивается техническими решениями. Современные аппараты для лучевой терапии позволяют существенно снизить или избежать повреждения окружающих тканей благодаря широким возможностям планирования облучения – расчетам дозовой нагрузки на опухоль и перифокальные ткани. Поскольку доза на поверхности выше, чем в опухоли (поглощенная доза уменьшается вдвое на глубине 5–6 см), в лучевой терапии используется многопольное облучение; накопление дозы в опухоли происходит при облучении под различными углами к телу пациента. Удастся снизить удельную дозу на поверхности при сохранении терапевтически эффективной дозы в опухоли. Используются мультилепестковые коллиматоры, точно повторяющие форму опухоли. Во время вращения источника вокруг тела пациента лепестки коллиматора перемещаются и формируют поле для каждого угла облучения; таких позиций во время сеанса лучевой терапии может быть много. Кроме того, значения ОБЭ нейтронов увеличиваются по мере уменьшения их энергии. В толще тканей, где нейтроны замедляются, ОБЭ ожидается выше, чем на коже. Однако, учитывая сложность определения ОБЭ, этот вопрос представляется недостаточно определенным. Для его решения требуются испытания *in vivo*.

В настоящем сообщении показано, что физико-технические параметры экспериментальной установки НГ-24 обеспечивают поток нейтронов с биологическими характеристиками, приемлемыми для противоопухолевой радиотерапии. Следующая приоритетная задача – создание терапевтического прототипа, сочетающего высокую противоопухоле-

вую эффективность нейтронов, конформность облучения и выполнение требований безопасности пациентов и персонала.

## ВЫВОДЫ

Безопасное компактное устройство НГ-24 генерирует поток быстрых нейтронов, что позволяет подвести дозу облучения, достаточную для индукции выраженного антипролиферативного ответа в культуре опухолевых клеток.

Повреждение целостности ДНК и задержка смены фаз клеточного цикла в ответ на нейтронное облучение

выражены независимо от статуса проапоптотического белка p53. Этот результат предполагает эффективность быстрых нейтронов для элиминации опухолевых клеток, в которых не функционируют отдельные молекулярные механизмы контроля баланса выживания и гибели. ●

*Работа поддержана грантом  
Минобрнауки Российской Федерации  
(соглашение № 14.W03.31.002 с Институтом  
биологии гена РАН).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Specht H.M., Neff T., Reuschel W., Wagner F.M., Kampf S., Wilkens J.J., Petry W., Combs S.E. // *Front. Oncol.* 2015. V. 5. P. 262.
2. Valcović V. 14 MeV neutrons: Physics and applications. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2015. 516 p.
3. Сыромуков С.В., Степнов В.В. Генератор нейтронов. – Полезная модель к патенту РФ № 166092 от 03.06.2016.
4. Syromukov S.V., Stepnov V.V., Dobrov R.V., Sysoev V.I., Mel'nik A.V., Bogatikov K.V., Starostin A.N., Letichevskii R.D. // *Atomic Energy.* 2015. V. 119. P. 68–71.
5. Sevast'yanov V.D., Kovalenko O.I., Orlov A.V., Shibaev R.M., Obudovskii S.Yu., Portnov B.D., Batyunin A.V., Kashchuk Yu.A. // *Measur. Tech.* 2016. V. 59. P. 994–1001.
6. Syromukov S.V. // *Atomic Energy.* 2018. V. 123. P. 267–274.
7. Литяев В.М., Ульяненко С.Е., Корякин С.Н., Бровин А.И., Сыромуков С.В., Боголюбов Е.П., Рыжков В.И., Горбушин Н.Г. Аппарат для дистанционной нейтронной терапии. Патент РФ № 2526244 от 28.08.2013.
8. Agostinelli S., Allison J., Amako K., Apostolakis J., Araujo H., Arce P., Asai M., Axen D., Banerjee S., Barrand G., et al. // *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. Section A.* 2003. V. 506. P. 250–303.
9. Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J.P., Sedivy J.M., Kinzler K.W., Vogelstein B. // *Science.* 1998. V. 282. P. 1497–1501.
10. Tikhomirov A.S., Lin C.Y., Volodina Y.L., Dezhenkova L.G., Tatarskiy V.V., Schols D., Shtil A.A., Kaur P., Chueh P.J., Shchekotikhin A.E. // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 148. P. 128–139.
11. Nadysev G.Y., Tikhomirov A.S., Lin M.-H., Yang Y.-T., Dezhenkova L.G., Chen H.-Y., Kaluzhny D.N., Schols D., Shtil A.A., Shchekotikhin A.E., et al. // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 143. P. 1553–1562.
12. Volodina Y.L., Dezhenkova L.G., Tikhomirov A.S., Tatarskiy V.V., Kaluzhny D.N., Moisenovich A.M., Moisenovich M.M., Isagulieva A.K., Shtil A.A., Tsvetkov V.B., et al. // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 165. P. 31–45.