

ОЦЕНКА РАННИХ И ОТСРОЧЕННЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЭФФЕКТОВ НА МЫШАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ 1- β -D-АРАБИНОФУРАНОЗИЛЦИТОЗИНА И ПРОТОНОВ НА АСЦИТНЫЕ КЛЕТКИ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА *ex vivo*

*О. М. Розанова^а, Т. А. Белякова^{а, 1}, Е. Н. Смирнова^а,
А. В. Борейко^б, В. Н. Чаусов^б*

^а Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

^б Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

Исследовано модифицирующее действие 1- β -D-арабинофуранозилцитозина (АраЦ) при облучении протонами асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) в условиях *ex vivo* на ранние и отсроченные противоопухолевые эффекты на мышах. Показана зависимость радиосенсибилизирующего действия АраЦ при действии протонов от дозы препарата по критериям противоопухолевого эффекта в короткие до 35 сут и отдаленные до 90 сут сроки после воздействия. Монотерапия АраЦ увеличивает медиану общей выживаемости и продолжительность жизни мышей-опухоленосителей независимо от концентрации. Полученные на нашей биомедицинской модели данные укладываются в имеющиеся представления о молекулярных механизмах индукции, репарации потенциально летальных повреждений ДНК и их влиянии на ранние и отдаленные последствия после воздействия ингибиторов репарации, используемых для усиления протонной терапии.

The modifying effect of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine (AraC) on early and remote antitumor effects in mice exposed to protons in *ex vivo* conditions was studied. The dependence of the radiosensitizing effect of AraC under the action of protons on the dose of the drug according to the criteria of the antitumor effect in the short term up to 35 days and the long term up to 90 days after exposure is shown. AraC monotherapy increases median overall survival and lifespan of tumor-bearing mice regardless of concentration. The data obtained in our biomedical model are consistent with existing understanding of the molecular mechanisms of induction and repair of potentially lethal DNA damage and their impact on early and late consequences following exposure to repair inhibitors used to enhance proton therapy.

PACS: 87.53.–j; 87.56.bd; 87.19.xj

¹E-mail: belyakovatanya@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

В связи с современными требованиями медицины при лечении онкологических заболеваний в фокусе экспериментальных работ — поиск способов преодоления резистентности наиболее опасных видов солидных опухолей, локализованных вблизи критических органов, применение неинвазивных методов лечения, сокращение сроков реабилитации, снижение побочных реакций и риска рецидивирования [1, 2]. В последнее десятилетие во всем мире интенсивно развиваются центры лучевой терапии (ЛТ), оснащенные установками для протонной терапии (ПТ) опухолей. ПТ особенно подходит в тех случаях, когда альтернативные методы лечения не обеспечивают адекватного эффекта, а традиционная ЛТ представляет высокий риск для пациента [2]. Более 250 тыс. пациентов в мире получили ПТ для лечения как наиболее распространенных, так и редких видов рака, особенно эффективным этот вид терапии оказался для опухолей головного мозга, головы и шеи, а также рака у детей. В России успешно работают несколько радиологических центров, в которых для ПТ используются отечественные (Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Обнинск) и ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт» (Гатчина)) и зарубежные установки (Медицинский институт Березина Сергея (МИБС) (Санкт-Петербург), ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской радиологии и онкологии» ФМБА (Димитровград)). К концу 2024 г. в нашей стране более 11 000 пациентов прошли курсы ПТ (<https://www.ptcog.ch/>). Для дальнейшего совершенствования ПТ и расширения областей ее применения продолжается поиск способов усиления эффекта протонного излучения (ПИ), в частности, с помощью гипофракционированного режима облучения опухолей [3], комбинации с другими излучениями [4] или химическими радиосенсибилизаторами [5]. В российских центрах ПТ, в которых используется технология облучения опухолей тонким сканирующим пучком протонов, уже достаточно клинических данных о том, что одним из перспективных направлений, в котором возможно максимально использовать преимущество высокоточного облучения мишени сканирующим пучком, является применение схем гипофракционирования с резким повышением однократной дозы облучения и сокращения количества фракций [6].

Ранее нами были исследованы закономерности индукции и роста опухолей у мышей при однократном облучении сканирующим пучком протонов в дозах 30, 60 и 80 Гр (равных суммарной очаговой дозе при конвенциональной ЛТ) клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) в условиях *ex vivo* и *in vivo*. Показано, что частота индукции опухолей после облучения протонами клеток асцитной карциномы Эрлиха в дозе 30 Гр при облучении *ex vivo* была ниже, чем после облучения *in vivo*, но при дозах 60 и 80 Гр число опухолей было одинаковым. Некоторые временные закономерности возникновения опухолей при облучении суспензии асцитных клеток в нормоксических условиях *ex vivo* значительно отличались от таковых при облучении солидной опухоли *in vivo*: период времени, в течение которого регистрировалось появление новых опухолей, в группах *ex vivo* был одинаковым для всех исследованных доз, а при облучении опухолей *in vivo* этот интервал зависел от величины дозы. Следует отметить, что скорость роста опухолей после облучения клеток протонами *ex vivo* и *in vivo* не зависела от дозы и времени их возникновения, но была значи-

тельно ниже, чем в контрольных необлученных группах [7–10]. Полученные данные продемонстрировали, что даже после однократного облучения опухолевых клеток протонами в дозах, сравнимых с общей очаговой дозой при конвенциональной ЛТ, остается достаточное количество клеток и факторов, инициирующих рост опухоли и являющихся причиной рецидивирования. Мы предположили, что поскольку регистрируемые в нашей работе показатели опухолевого роста являются интегральным результатом гибели, задержки деления разных по радиочувствительности клеток опухоли, стимулирования дифференцировки и пролиферации стволовых опухолевых клеток в условиях влияния микроокружения опухоли, а также вклада иммунных систем организма, то предложенная биомедицинская модель облучения опухолевых клеток в асцитном состоянии и в форме солидной АКЭ может служить полезным инструментом для быстрого и информативного скрининга новых режимов ПТ.

Другим перспективным направлением для повышения эффективности ПТ злокачественных опухолей является поиск химических сенсibilизаторов, которые бы усиливали действие протонов, среди которых наиболее популярными (по количеству работ) являются ингибиторы репарации повреждений ДНК [11–13], которые уже давно успешно применяются в клиниках для химиотерапии ряда опухолей. В связи с возможностью анализа большого количества экспериментальных данных о механизмах действия, эффективности и недостатках применяемых средств химиотерапии и традиционной ЛТ при лечении различных видов рака в последние годы наметилась тенденция использования сочетанного действия облучения с препаратами из различных химических классов, которые уже хорошо изучены и широко применяются при лечении других заболеваний [14]. Радиосенсibilизаторы усиливают способность излучения вызывать необратимые, летальные повреждения в опухолевых клетках [15] за счет различных механизмов: избирательного накопления в опухолевых клетках, ингибирования клеточных рецепторов, регулирования сигнальных каскадов, активирующих апоптоз опухолевых клеток или ингибирующих процессы репарации повреждений ДНК [16]. Поскольку эффективный сенсibilизатор должен иметь также минимальные побочные эффекты со стороны нормальных тканей, то чаще всего разработка схем сочетанного действия ЛТ и противоопухолевых агентов направлена на снижение доз и концентраций, в которых они эффективны при использовании по отдельности, но обладают высокой общей токсичностью. Опыт использования целого ряда модификаторов в сочетании с новыми сведениями о механизмах их действия и идеями по совершенствованию практического применения свидетельствует о перспективности развития этого направления и в отношении ПТ [14, 17–19].

В Лаборатории радиационной биологии (ОИЯИ, Дубна) был предложен принципиально новый подход в использовании химических модификаторов для повышения биологической эффективности редкоионизирующих излучений, основанный на увеличении выхода радиационно-индуцированных летальных повреждений — энзиматических двунитевых разрывов ДНК (ЭДР ДНК) [20, 21]. Было исследовано модифицирующее действие 1- β -D-арабинофуранозилцитозина (АраЦ), который является основным действующим веществом многих коммерческих препаратов (Цитозар[®], Алексан[®], Цитарабин-ЛЭНС[®], Цитастадин[®]) при химиотерапии острых и хронических лейкозов. Как известно, АраЦ блокирует репарацию однонитевых разрывов (ОР) ДНК. Установлено, что ингибитор оказывает больший модифицирующий эффект

при действии излучений фотонной природы, чем при действии ускоренных заряженных частиц. Это является свидетельством того, что генезис формируемых двунитевых разрывов (ДР) ДНК при γ -облучении и при действии ускоренных заряженных частиц различен. Как известно, с ростом линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучений изменяется спектр индуцируемых повреждений ДНК: уменьшается количество ОР ДНК и возрастает количество прямых ДР ДНК. Как было показано ранее [22, 23], при действии редкоионизирующих излучений ЭДР ДНК формируются из длительно нерепарируемых ОР ДНК вследствие блокирования ДНК-полимеразной активности на таких сайтах и атаки оппозитных нитей эндонуклеазами типа S1, при этом вклад ЭДР ДНК в суммарный выход ДР ДНК может быть весьма высок [24–26]. Эффективность метода продемонстрирована в экспериментах *in vitro* на различных линиях опухолевых клеток (глиобластома U87, меланома B16) и подтверждена *in vivo* на мышах с трансплантированными клетками меланомы B16, где показано значительное подавление роста опухоли и снижение доли опухолевых стволовых клеток. Применение предложенного подхода дает возможность повышения биологической эффективности пучков протонов, значительно сближая области использования протонных и углеродных ускорителей для терапевтических целей.

В развитие подобных подходов по усилению ПТ ранее нами было исследовано модифицирующее противоопухолевое действие АраЦ в сочетании с облучением протонами в дозе 10 Гр клеток АКЭ в условиях *in vivo* и *ex vivo*. Выявлены закономерности проявления противоопухолевого эффекта АраЦ в комбинации с ПИ при облучении асцитных клеток *ex vivo* и *in vivo*, которые указывают на отличие в действии АраЦ на асцитные клетки как на этапе первичного онкогенеза, так и на поздних стадиях процесса развития новообразования. Также определено влияние условий инкубации, облучения, концентрации, способов введения препарата на величину радиосенсибилизирующего эффекта [12].

Для дальнейшего изучения возможностей ПТ также актуальной остается проблема поиска и разработки удобных биомедицинских экспериментальных моделей опухолей *in vivo* или приближенных к условиям, которые бы максимально учитывали такие специфические особенности взаимодействия высокоэнергетических заряженных частиц с живой материей, как эскалация дозы и мощности в точно локализованном объеме и низкая зависимость от содержания кислорода в тканях, и позволяли бы не только оценить эффекты в зависимости от объема облучаемой ткани, дозы одной фракции, интервала между фракциями и суммарной дозы облучения на противоопухолевую эффективность и ранние лучевые последствия, но и наблюдать за рецидивами и развитием других отдаленных реакций на уровне организма. Модель опухолевого роста клеток асцитной карциномы Эрлиха широко и достаточно давно используется на различных линиях лабораторных мышей для исследования противоопухолевого действия различных видов излучений и тестирования широкого спектра фармакологических и природных препаратов [27, 28]. Это агрессивная, быстрорастущая карцинома, солидная форма которой не метастазирует, что удобно для наблюдения. Асцитные клетки карциномы можно имплантировать в разные локализации на теле животного, существует возможность точно контролировать облучаемый объем солидной формы АКЭ и регистрировать местные лучевые реакции [29, 30]. Ранее на этой модели нам удалось отработать условия и провести анализ влияния разных факторов (величины дозы, количества фракций, облучения в гипоксических и нор-

моксических условиях, количества обрабатываемых клеток) на противоопухолевую эффективность не только гипофракционированного действия ПТ, а также ионов углерода и гелия [31], что позволило получить важные результаты относительно величины ОБЭ по критериям противоопухолевой эффективности частиц, генерируемых на экспериментальных терапевтических установках, и значительно упростило логистику проведения экспериментов в условиях ускорителей, доступ к которым в исследовательских целях ограничен во всем мире.

Целью настоящей работы являлась оценка ранних и отсроченных противоопухолевых эффектов на мышах при действии 1- β -D-арабинофуранозилцитозина и протонов при облучении асцитных клеток карциномы Эрлиха *ex vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования были выбраны аутбредные нелинейные мыши колонии SHK (35 г $\pm$ 10%) в возрасте 2 мес. Животных до начала исследования содержали не менее 14 дней для адаптации при групповом содержании в клетках, ежедневно контролируя клиническое состояние животных путем визуального осмотра. Все процедуры с животными были рассмотрены и одобрены Комиссией по биологической безопасности и биоэтике Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (протокол № 11 от 03.03.2025) с целью оценки соответствия планируемых процедур действующим законам и правилам, касающимся испытаний на животных и гуманного обращения с ними. Всего было использовано 110 мышей.

В качестве модели опухолевого роста была выбрана солидная форма асцитной карциномы Эрлиха. Линия опухолевых клеток была получена из ФГБУН «РНЦ им. Н. Н. Блохина» (Москва, Россия). Культуру АКЭ размораживали по стандартной процедуре и культивировали с помощью 2-кратной внутрибрюшинной инокуляции мышам в течение двух недель. В день проведения эксперимента у животных в асептических условиях извлекали асцитную жидкость и трижды промывали опухолевые клетки фосфатно-солевым буферным раствором с помощью центрифугирования в течение 5 мин при 1000 об/мин на центрифуге CM-6 (ELMI, Латвия).

За 1 ч до облучения в микропробирку с $20 \cdot 10^6$ асцитных клеток (для имплантации 10 мышам) добавляли препарат АраЦ в различных концентрациях. Для исследования были использованы три расчетные дозы препарата АраЦ: 20, 16,5, 180 мкМ/мл. Суспензию перемешивали с помощью вортекса Reax top (Heidolph) в течение 2–3 с при частоте встряхивания 1200 об/мин. Клетки содержали в присутствии исследуемого препарата при комнатной температуре около 3 ч, включая 1 ч до облучения, время облучения, транспортировку к источнику облучения, время до имплантации мышам. Концентрации и условия инкубирования были выбраны на основе литературных данных. В работе [13] при сочетанном действии АраЦ в концентрации 20 мкМ/мл с протонами показано увеличение количества радиационно-индуцированных фокусов в клетках глиобластомы в 2,3 раза по сравнению с монотерапией протонами. Показано также, что АраЦ усиливает радиационное повреждение ДНК в широком диапазоне концентраций АраЦ от 20 мкМ/мл до 20 мМ/мл, который не является токсичным для клеток по клеточной выживаемости [25]. В исследованиях противоопухолевого

действия ПИ на мышах *in vivo* было показано усиление этого эффекта с помощью внутривенного введения за 1 ч до облучения АраЦ в дозе 180 мкМ/мл [11, 32].

Микропробирки с суспензией клеток АКЭ в концентрации $20 \cdot 10^6$ клеток/мл после внесения АраЦ или без него облучали при комнатной температуре протонами в дозе 10 Гр. Источником протонного излучения служил синхротрон комплекса ПТ «Прометеус» Центра коллективного пользования «Физико-технического центра» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физического института им. П. Н. Лебедева Российской академии наук (Протвино). Для облучения микропробирки размещали в водном фантоме, затем с помощью конусной лучевой томографии определяли облучаемый объем и в специально разработанной трехмерной планирующей системе составляли план облучения. Облучение клеток проводили с одного направления методом сканирования по всему объему тонким пучком в модифицированном пике Брэгга с энергией протонов 111–123 МэВ, что моделирует среднестатистические условия, используемые в центрах ПТ [33]. Время облучения составляло около 5 мин. Поглощенная доза контролировалась с помощью дозиметра PTW Unidos webline с ионизационной камерой (PTW PinPoint 3D-Chamber 31022).

Для получения солидных опухолей АКЭ имплантацию опухолевых клеток осуществляли внутримышечно в бедро левой лапы мыши в количестве $2 \cdot 10^6$ клеток в объеме 100 мкл. Мышам контрольной группы имплантировали такое же количество необлученных клеток АКЭ, суспензия которых подвергалась имитации условиям хранения, внесения растворителя (физиологический раствор), транспортировки и облучения. После имплантации клеток АКЭ ежедневно регистрировалась частота индукции у них солидных опухолей АКЭ, динамика и скорость роста опухолей в течение 90 сут, а также летальность животных. Опухоль считали индуцированной при достижении объема не менее $0,40 \text{ см}^3$, который доступен пальпации и инструментальному измерению. Не реже двух раз в неделю с помощью штангенциркуля у каждой мыши измеряли три ортогональных диаметра опухоли. Объем опухоли (в см^3) рассчитывали по стандартной формуле: $\text{объем опухоли} = \pi/6 \cdot d1 \cdot d2 \cdot d3$, где $d1$ – $d3$ — три ортогональных диаметра. При достижении объема опухоли 10 см^3 мышей подвергали эвтаназии в соответствии с принципами гуманного обращения с лабораторными животными и считали эту дату днем гибели животных. На основе регистрируемых измерений определяли величину торможения роста опухоли (ТРО), индекс роста опухоли (ИРО), увеличение продолжительности жизни (УПЖ), количество ремиссий и вылеченных животных согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [34].

Для всех данных применена описательная статистика. Данные проверены на соответствие закону нормального распределения. В случае нормального распределения рассчитаны среднее значение и стандартное отклонение. В случаях несоответствия данных закону нормального распределения рассчитаны медиана и квартильный размах. Статистическую оценку различий между группами, имеющими нормальное распределение, проводили с помощью t-критерия Стьюдента; в остальных случаях использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для анализа кривых выживаемости использовался тест Log-Rank. Различия определены при уровне значимости $p \leq 0,05$. Результаты по всем показателям противоопухолевой эффективности проанализированы относительно необлученного позитивного контроля, а также определены величины модификации протонного излучения с помощью двух концентраций

исследуемого препарата. Статистический анализ выполнялся с помощью программно-обеспечения Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена динамика роста солидной АКЭ в течение 35 сут после имплантации обработанных *ex vivo* опухолевых клеток. В контрольной группе у 100 % мышей индуцировалась солидная опухоль АКЭ, которая пальпировалась на 5-е сутки после имплантации клеток и через 35 сут достигала стандартного для этой модели объема $\sim 10 \text{ см}^3$.

В группах, обработанных различными концентрациями АраЦ, не наблюдали снижения объема солидных АКЭ относительно необработанного контроля (рис. 1, а). В группах комбинированного воздействия статистически значимое снижение объема опухоли, относительно только ПТ в дозе 10 Гр, наблюдали при концентрациях 16,5 и 180 мМ (рис. 1, б). На основе полученных в течение 35 сут измерений были высчитаны показатели, характеризующие величину противоопухолевых эффектов: ТРО и ИРО, которые позволяют более детально оценить влияние АраЦ на различные этапы индукции и развития опухоли [34]. По критерию ТРО клинически значимый эффект ($\text{ТРО} > 50\%$) подавления роста солидной опухоли АКЭ при обработке клеток только АраЦ относительно контроля не был выявлен ни для одной исследуемой концентрации препарата. Наибольший выявленный эффект со значениями ТРО 30–40 % был отмечен в группе при концентрации 180 мМ с 10-х по 20-е сутки после имплантации АКЭ, что свидетельствует о слабом противоопухолевом эффекте самой высокой концентрации АраЦ.

При комбинированной терапии клинически значимый эффект ТРО относительно ПИ был выявлен только в группе «180 мМ АраЦ + ПИ» с 10-х по 30-е сутки после имплантации обработанных клеток АКЭ, а на 35-е сутки ТРО составило 48 %, что близко к клинически значимым значениям, а увеличение длительности сохранения

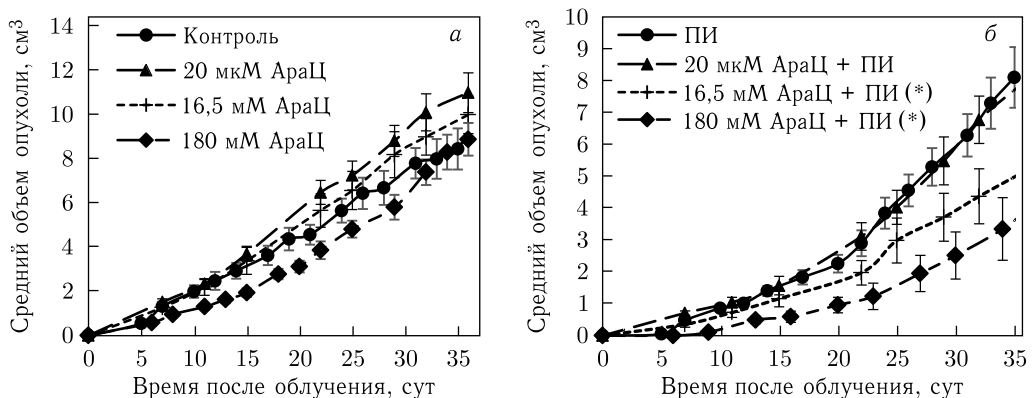


Рис. 1. Динамика роста опухолей у мышей после имплантации асцитных клеток, обработанных разными концентрациями АраЦ (а) или при комбинированном воздействии с протонами (б).

* — статистически значимые различия относительно группы ПИ. Статистическая значимость оценивалась с помощью U-критерия Манна–Уитни ($p \leq 0,05$)

этого эффекта практически на весь период развития опухоли свидетельствует о значительном усилении эффекта ПТ с помощью АраЦ. Для группы «16,5 мМ АраЦ + ПИ» значения ТРО с 25-х по 35-е сутки находились в диапазоне 22–36 %. Для группы «20 мМ АраЦ + ПИ» по показателю ТРО наблюдали отсутствие противоопухолевого эффекта.

При определении ИРО, характеризующего устойчивость эффекта, было показано, что для групп, обработанных только АраЦ, значение ИРО было ниже, чем в контроле на 7 % для концентрации 20 мМ АраЦ, на 16 % — для 16,5 мМ АраЦ и на 23 % — для 180 мМ АраЦ, что свидетельствует о более выраженном торможении опухолевого роста по мере увеличения концентрации. ИРО в группах комбинированного воздействия для концентрации 20 мМ увеличивалось на 7 % относительно монотерапии протонами, а в группах «16,5 мМ АраЦ + ПИ» и «180 мМ АраЦ + ПИ» уменьшалось на 28 и 52 % соответственно. Полученные результаты выявили, что обработка 20 млн асцитных клеток АраЦ в концентрации 180 мМ АраЦ *ex vivo* способна эффективно тормозить развитие и рост солидных опухолей относительно ПТ в течение 35 сут. Ранее при исследовании влияния однократного внутрибрюшинного введения АраЦ в этой же концентрации мышам с солидной опухолью в экспоненциальной стадии развития до облучения в той же дозе ПИ нами было показано, что объем опухоли у мышей в присутствии АраЦ уменьшался в 1,2 раза по сравнению с группой, облу-

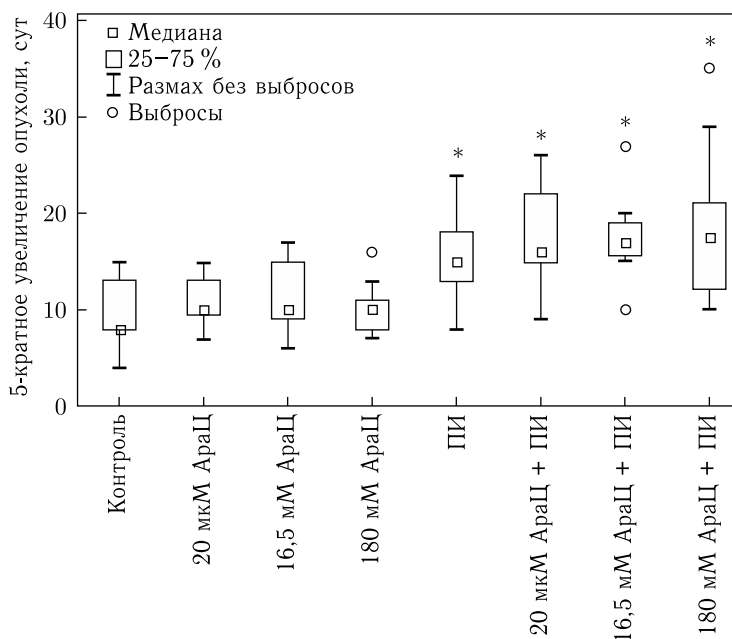


Рис. 2. Время роста опухолей у мышей после имплантации асцитных клеток, облученных *ex vivo* протонами в дозе 10 Гр и при комбинированном воздействии с АраЦ в различной концентрации. Данные представлены в виде количества суток, необходимых для увеличения объема опухоли в пять раз по сравнению с первым измеренным объемом. Объемы нормализованы к первому измеренному объему. * — статистически значимые различия от контрольной группы. Статистическая значимость оценивалась с помощью критерия Тьюки ($p \leq 0,05$)

ченной только протонами [12], что свидетельствует о том, что используемая в работе биомедицинская модель может быть применена для первичного подбора концентраций и режимов введения радиосенсибилизаторов.

Через 60 сут после имплантации клеток АКЭ в группах «16,5 мМ АраЦ + ПИ» и «180 мМ АраЦ + ПИ» частота ремиссий (количество мышей без опухолей) была одинаковой и составила 11%, к 90-м суткам показатель «число полностью вылеченных животных» составил 11%. Статистически значимые различия по динамике индукции опухолей в течение 90 сут между группами с комбинированной терапией и группой ПИ выявлены только в варианте «180 мМ АраЦ + ПИ» ($p \leq 0,05$). Таким образом, при сочетанном действии ПИ и АраЦ в концентрациях 16,5 и 180 мМ по критериям частоты индукции опухолей, количеству ремиссий и полностью излеченных животных наблюдали значительное усиление противоопухолевого действия ПИ.

У всех мышей с опухолями, индуцированными в течение 90 сут, измеряли скорость роста опухолей у каждой мыши в группе. На рис. 2 представлено время роста опухолей у мышей, которое определялось как время, необходимое для 5-кратного увеличения исходного объема после обработки опухолевых клеток *ex vivo*.

В контрольной группе без терапии среднее время 5-кратного увеличения объема опухоли составило (9 ± 3) сут. В группах, обработанных только АраЦ в различных концентрациях, этот показатель равнялся (11 ± 3) сут для всех групп и статистически не отличался от контроля, т. е. действия АраЦ по критерию времени роста опухолей не выявлено. Для ПИ в дозе 10 Гр время 5-кратного увеличения объема опухоли составило (15 ± 4) сут, что статистически достоверно отличалось от контроля. При комбинированном воздействии ПИ и всех концентраций АраЦ этот показатель равнялся (18 ± 5) сут, что статистически достоверно отличалось от группы контроля. Таким образом, если по показателям ТРО, ИРО, числу ремиссий и вылеченных животных наблюдалось радиосенсибилизирующее влияние АраЦ, то на скорости роста индивидуальных опухолей такого эффекта не выявлено.

На рис. 3 представлена динамика общей выживаемости мышей-опухоленосителей при имплантации клеток, обработанных АраЦ в разных концентрациях, от момента имплантации опухолевых клеток до гибели животного по любой причине.

В контрольной группе гибель мышей наблюдали, начиная с 19-х суток после имплантации асцитных клеток, а к 35-м суткам 100% животных погибло, что соответствует динамике гибели, характерной для этой модели опухолевого роста. Медиана общей выживаемости для контрольной группы составила 24 сут, для групп «20 мкМ АраЦ» и «180 мМ АраЦ» — 32 сут, для «16,5 мМ АраЦ» — 36 сут, что достоверно отличалось от контроля, но между обработанными группами статистически достоверных различий не выявлено. Максимальная продолжительность жизни животных без терапии составила 35 сут. В группе «16,5 мМ АраЦ» гибель началась на 22-е сутки, а максимальная продолжительность жизни составляла 39 сут. В группах «20 мкМ АраЦ» и «180 мМ АраЦ» гибель началась позже, чем в контроле, на 29-е сутки после имплантации АКЭ, но максимальная продолжительность жизни не отличалась от контроля (36 сут). Таким образом, во всех группах мышей, которым были имплантированы обработанные АраЦ клетки, динамика гибели мышей-опухоленосителей статистически значимо отличалась от динамики гибели мышей без терапии, что свидетельствует о положительном влиянии исследуемых концентраций АраЦ на выживаемость мышей-опухоленосителей.

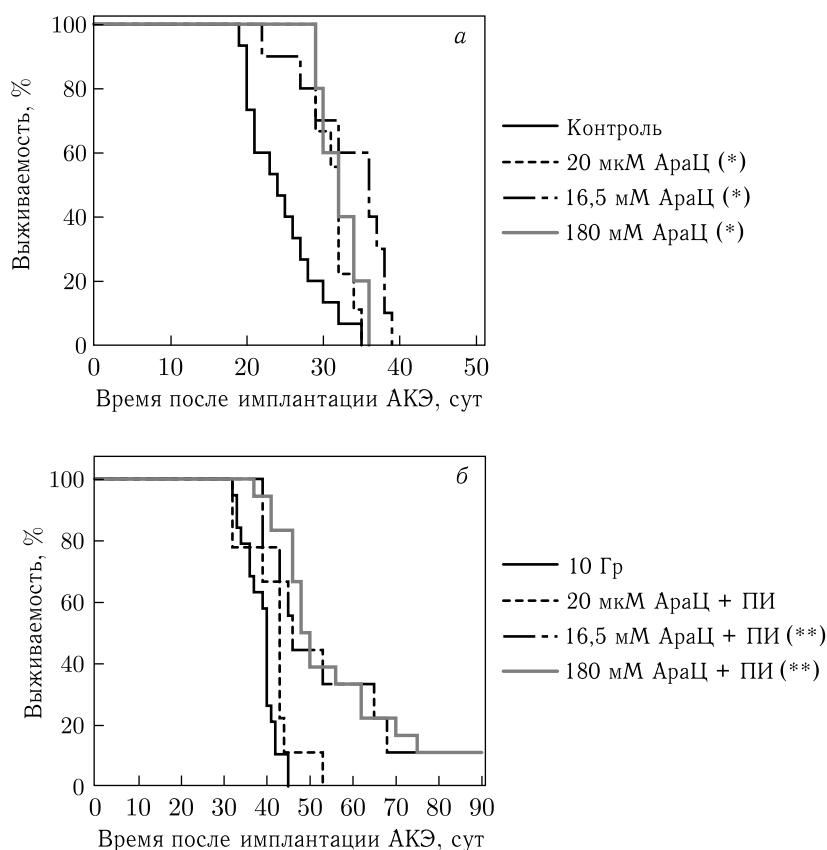


Рис. 3. Динамика гибели мышей после имплантации им асцитных клеток, обработанных АраЦ в разных концентрациях (а) или при комбинированном воздействии с протонами (б). * — статистически значимые различия относительно контрольной группы, ** — статистически значимые различия относительно группы ПИ. Различия оценивали с помощью теста Log-Rank ($p \leq 0,05$)

Гибель мышей после имплантации облученных только 10 Гр ПИ АКЭ наблюдали с 32 сут, медиана общей выживаемости составила 40 сут, а максимальная продолжительность жизни — 45 сут, что достоверно выше, чем в контрольной группе. В группе «20 мкМ АраЦ + ПИ» гибель начиналась в те же сроки, что и в группе «ПИ», медиана выживаемости была 43 сут, а к 53-м суткам наблюдали 100%-ю гибель животных, и статистически значимых различий по динамике гибели мышей между этими группами не выявлено. В группах «16,5 мМ АраЦ + ПИ» и «180 мМ АраЦ + ПИ» гибель мышей начиналась на 37-е и 39-е сутки соответственно. Медиана общей выживаемости для группы «16,5 мМ АраЦ + ПИ» была 46 сут, а для «180 мМ АраЦ + ПИ» — 48 сут. При близких по значению критериям выживаемости мышей в группах ПИ и сочетанного воздействия с АраЦ, к 90-м суткам в группах «16,5 мМ АраЦ + ПИ» и «180 мМ АраЦ + ПИ» в отличие от ПИ количество выживших мышей составило 11 %. Динамика гибели животных при комбинированной

Влияние АраЦ в разной концентрации и ПИ на увеличение продолжительности жизни мышей-опухоленосителей

Группы	СПЖ, сут	УПЖ относительно контроля, %	УПЖ относительно ПИ, %
Контроль	25 ± 5	—	—
20 мкМ АраЦ	31 ± 2	27*	—
16,5 мМ АраЦ	33 ± 6	35*	—
180 мМ АраЦ	32 ± 3	30*	—
ПИ	39 ± 4	56*	—
20 мкМ АраЦ + ПИ	41 ± 6	67*	7
16,5 мМ АраЦ + ПИ	54 ± 17	119*	40**
180 мМ АраЦ + ПИ	56 ± 16	126*	44**

* $p \leq 0,05$ — статистически значимые различия относительно контрольной группы.
 ** $p \leq 0,05$ — статистически значимые различия относительно ПИ. Различия оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни.

терапии с «16,5 мМ АраЦ + ПИ» и «180 мМ АраЦ + ПИ» была одинаковой для этих концентраций и статистически значимо отличалась ($p \leq 0,01$) от таковой при монотерапии ПИ. Таким образом, по критерию выживаемости мышей-опухоленосителей наблюдали усиление положительного влияния АраЦ на отсроченные последствия ПТ, которые проявлялись в снижении общей токсичности.

На основе динамики выживаемости мышей были определены показатели увеличения продолжительности жизни (УПЖ) [34]. Как видно из таблицы, во всех экспериментальных группах наблюдалось клинически значимое увеличение показателя продолжительности жизни по сравнению с контрольной группой ($\geq 25\%$), что свидетельствует об увеличении продолжительности жизни мышей как при монотерапии АраЦ или ПТ, так и при комбинации воздействий. Значения УПЖ были значительно выше в группах комбинированного воздействия, а при концентрациях АраЦ 16,5 и 180 мМ по сравнению с концентрацией 20 мкМ наблюдалось двукратное увеличение УПЖ. Относительно группы «ПИ» в группах сочетанного воздействия клинически значимое УПЖ также было выявлено при обработке клеток АКЭ АраЦ в дозах АраЦ 16,5 и 180 мМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показана зависимость радиосенсибилизирующего действия АраЦ при действии ПИ от дозы препарата по критериям противоопухолевого эффекта в короткие, до 35 сут, и отдаленные, до 90 сут, сроки после воздействия. Монотерапия АраЦ увеличивает медиану общей выживаемости и продолжительность жизни мышей-опухоленосителей независимо от концентрации. Полученные на нашей биомедицинской модели данные укладываются в имеющиеся представления о молекулярных механизмах индукции, репарации потенциально летальных повреждений ДНК и их влияния на ранние и отдаленные последствия после воздействия ингибиторов репарации, используемых для усиления ПТ.

Полученные результаты по исследованию противоопухолевого действия АраЦ в зависимости от концентрации в сочетании с ПИ указывают не только на его ингибиру-

ющее влияние на начальные этапы канцерогенеза, но и регуляторную роль в развитии отсроченных эффектов, которая проявлялась в высоком проценте ремиссий и полностью излеченных животных. Использование ПИ в высокой дозе для высокоточного локального облучения опухоли у мышей в комбинации с АраЦ наметило дальнейшие пути изучения потенциала препарата для усиления ПТ, понимания вклада различных по качеству повреждений ДНК и их репарации в резистентность опухолей, продемонстрировало хорошую воспроизводимость результатов на используемой биомедицинской модели и возможность сравнения результатов с накопленными обширными данными, полученными ранее на клеточных моделях, определило эффективную для терапии концентрацию АраЦ с низкой токсичностью, что полезно для решения вопроса о дальнейшем подборе режимов облучения и введения препарата, а также является необходимым этапом скрининга новых фармакологических препаратов с точки зрения использования их для усиления ПТ и разработки батареи релевантных моделей для изучения биологического действия новой ускорительной техники.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность руководителю Центра коллективного пользования ФТЦ ФИАН А. Е. Шемякову за помощь в проведении облучения на комплексе протонной терапии «Прометеус» и дозиметрическое сопровождение экспериментов.

Финансирование. Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке из средств договора НИР №090-02198 с Объединенным институтом ядерных исследований (Дубна, Россия) и в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН №075-00224-26-02.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Исследования проводили в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (Federation of European Laboratory Animal Science Associations, FELASA), а план экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 11 от 03.03.2025).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paganetti H., Beltran C., Both S., Dong L., Flanz J., Furutani K., Grassberger C., Grosshans D.R., Knopf A.-Ch., Langendijk J.A., Nystrom H., Parodi K., Raaymakers B.W., Richter Ch., Sawakuchi G.O., Schippers M., Shaitelman S.F., Teo B.K.K., Unkelbach J., Wohlfahrt P., Lomax T. Roadmap: Proton Therapy Physics and Biology // *Phys. Med. Biol.* 2021. V. 66, No. 5. 05RM01.
2. Balosso J. et al. A Randomized Controlled Phase III Study Comparing Hadrontherapy with Carbon Ions versus Conventional Radiotherapy — Including Photon and Proton Therapy — for the Treatment of Radioresistant Tumors: The ETOILE Trial // *BMC Cancer*. 2022. V. 22, No. 1. P. 575.
3. Marcu L.G. Radiation Therapy Fractionation in the Modern Era of Head and Neck Oncology towards an Improved Therapeutic Window // *Acad. Oncology*. 2024. V. 1, Iss. 2. 14 p.
4. Балакин В.Е., Розанова О.М., Смирнова Е.Н., Белякова Т.А., Шемяков А.Е., Стрельникова Н.С. Комбинированное действие нейтронного и протонного излучений на рост со-

- лидной формы асцитной карциномы Эрлиха и отдаленные последствия у мышей // ДАН. Науки о жизни. 2021. Т. 498. С. 5–11.
5. Liu Y., Zhang P., Li F., Jin X., Li J., Chen W., Li Q. Metal-Based Nanoenhancers for Future Radiotherapy: Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells // *Theranostics*. 2018. V. 8, No. 7. P. 1824.
6. Santos A., Penfold S., Gorayski P., Le H. The Role of Hypofractionation in Proton Therapy // *Cancers*. Basel. 2022. V. 14, No. 9. P. 2271.
7. Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Белякова Т. А., Стрельникова Н. С., Смирнов А. В. Закономерности индукции и роста опухолей у мышей при облучении тонким сканирующим пучком протонов клеток крациномы Эрлиха *ex vivo* и *in vivo* // *Биофизика*. 2024. Т. 69, № 1. С. 183–192.
8. Balakin V. E., Rozanova O. M., Smirnova E. N., Belyakova T. A., Strelnikova N. S., Smirnov A. V., Shemyakov A. E. Growth Induction of Solid Ehrlich Ascitic Carcinoma in Mice after Proton Irradiation of Tumor Cells *Ex Vivo* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2023. V. 511, No. 1. P. 151–155.
9. Балакин В. Е., Белякова Т. А., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Стрельникова Н. С., Кузнецова Е. А. Противоопухолевое действие высоких доз ионов углерода и рентгеновского излучения при облучении клеток асцитной карциномы Эрлиха *ex vivo* // ДАН. Науки о жизни. 2024. Т. 515, № 1. С. 97–103.
10. Стрельникова Н. С., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Белякова Т. А., Смирнов А. В. Изучение эффективности высоких доз протонов на индукцию солидных опухолей у мышей при облучении асцитных клеток карциномы Эрлиха *ex vivo* // *Биомедицина*. 2023. Т. 19, № 3Е. С. 66–70.
11. Замулаева И. А., Матчук О. Н., Селиванова Е. И., Якимова А. О., Мосина В. А., Корякин С. Н., Каприн А. Д., Борейко А. В., Бугай А. Н., Чаусов В. Н., Красавин Е. А. Радиобиологическое влияние комбинированного действия 1- β -D-арабинофуранозилцитозина и протонного излучения на меланому линии B16 *in vivo* // *Письма в ЭЧАЯ*. 2023. Т. 20, № 1(246). С. 70–71.
12. Белякова Т. А., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Стрельникова Н. С., Красавин Е. А., Борейко А. В. Модифицирующее действие 1- β -D-арабинофуранозилцитозина при облучении протонами клеток карциномы Эрлиха в условиях *in vivo* и *ex vivo* на рост солидной опухоли у мышей // *Письма в ЭЧАЯ*. 2025. Т. 22, № 2(259). С. 477–486.
13. Борейко А. В., Заднепрянец М. Г., Чаусов В. Н., Храшко Т. С., Кожина Р. А., Кузьмина Е. А., Тиунчик С. И., Красавин Е. А. Комбинированное действие ингибиторов синтеза ДНК и ускоренных протонов на клетки злокачественных опухолей // *Письма в ЭЧАЯ*. 2023. Т. 20, № 4(249). С. 698–708.
14. Gong L., Zhang Y., Liu C., Zhang M., Han S. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy // *Intern. J. Nanomed.* 2021. V. 16. P. 1083–1102.
15. Komarova L. N., Mel'nikova A. A., Baldov D. A. Synergetic Effects of the Combined Action of Carbon Ions and the Chemotherapy Drug Doxorubicin on Hela Cancer Cells // *Izv. Vuzov. Yad. Energetika*. 2021. V. 2021, No. 3. P. 158–168.
16. Deyctar S., Faccin E., Kazimova T., Knobel P. A., Telarovic I., Tschanz F., Waller V., Winkler R., Yong C., Zingariello D., Pruschy M. The Relative Biological Effectiveness of Proton Irradiation in Dependence of DNA Damage Repair // *Br. J. Radiol.* 2020. V. 93, No. 1107.
17. Ярмоненко С. П., Вайнсон А. А. Радиобиология человека и животных. М.: Высш. шк., 2004. 548 р.
18. Кылчыкбаев А. К. Радиомодификация лучевой терапии (обзор литературы) // *Вестн. КРСУ. State Educational Inst. of Higher Vocational Education Kyrgyz–Russian Slavic Univ.* 2024. V. 24, No. 1. P. 130–133.

19. Wainson A. A., Solovieva E. V. The Development of Proton Radiotherapy in Our Country // J. Oncology: Diagnostic Radiology and Radiotherapy. Non-Profit Partnership Soc. of Interventional Oncoradiologists. 2024. V. 7, No. 3. P. 9–14.
20. Красавин Е. А., Борейко А. В., Чаусов В. Н., Кузьмина Е. А., Кожина Р. А., Тиунчик С. И., Ильина Е. В., Куликова Е. А., Заднепрянец М. Г., Смирнова Е. В., Тимошенко Г. Н. Влияние ингибиторов синтеза ДНК на биологическую эффективность пучка протонов в модифицированном пике Брэгга // Письма в ЭЧАЯ. 2019. Т. 2, № 2(221). С. 181–190.
21. Патент на изобретение RU 2699670 C1, 09.09.2019. Заявка № 2018140538 от 16.11.2018. Способ повышения частоты образования двунитевых разрывов ДНК в клетках человека при действии ионизирующих излучений в условиях влияния радиомодификаторов / Красавин Е. А., Борейко А. В., Куликова Е. А., Буланова Т. С., Тимошенко Г. Н., Чаусов В. Н.
22. Harrison L., Malyarchuk S. Can DNA Repair Cause Enhanced Cell Killing Following Treatment with Ionizing Radiation? // Pathophysiology. 2002. V. 8, No. 3. P. 149–159.
23. Rydberg B. Radiation-Induced Heat-Labile Sites That Convert into DNA Double-Strand Breaks // Radiat. Res. 2000. V. 153, No. 6. P. 805–812.
24. Борейко А. В., Чаусов В. Н., Красавин Е. А., Равначка И., Стукова С. И. Влияние ингибиторов синтеза ДНК на индукцию и репарацию двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии излучений с разной ЛПЭ // Письма в ЭЧАЯ. 2011. Т. 8, № 4(167). С. 670–678.
25. Чаусов В. Н., Борейко А. В., Буланова Т. С., Заднепрянец М. Г., Ильина Е. В., Йежкова Л., Красавин Е. А., Кожина Р. А., Кузьмина Е. А., Куликова Е. А., Смирнова Е. В., Тиунчик С. И. Формирование прямых и энзиматических двунитевых разрывов ДНК в условиях влияния ингибиторов репарации при действии излучений разного качества // Письма в ЭЧАЯ. 2018. Т. 15, № 6(218). С. 573–588.
26. Чаусов В. Н., Борейко А. В., Красавин Е. А., Можаяева А. В., Равначка И. И., Тиунчик С. И., Тронов В. А. Закономерности индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии ускоренных тяжелых ионов различных энергий // Рад. биология. Радиоэкология. 2009. Т. 49, № 1. С. 73–77.
27. Иванов А. А., Насонова Т. А., Даренская Н. Г., Добрынина О. А., Сидорович Г. И. Экспериментальная модель исследования радиационного угнетения противоопухолевой резистентности // Там же. № 4. С. 449–455.
28. Балакин В. Е., Белякова Т. А., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Шемяков А. Е., Стрельникова Н. С. Использование модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей для исследования ранних и отдаленных последствий гипофракционированного протонного облучения // Биомедицина. 2021. Т. 17, № 3Е. С. 127–132.
29. Рыжов Н. И., Дерягин В. П., Савлачинская Л. А. Значение модели аденокарциномы Эрлиха в изучении механизмов канцерогенеза, противоопухолевой активности химических и физических факторов // Междунар. журн. прикл. и фундамент. исслед. 2019. № 4. С. 220–227.
30. Востроилова Г. А., Хохлова Н. А., Шабанов Д. И., Михайлов Е. В., Корчагина А. А., Шабунин Б. В., Некрасов А. В. Характеристика модели асцитной карциномы Эрлиха и перспективы ее применения в экспериментальной фармакологии ветеринарных препаратов // Лаб. животные для науч. исслед. 2023. № 3. С. 108–117.
31. Балакин В. Е., Белякова Т. А., Розанова О. М., Смирнов А. В., Смирнова Е. Н., Стрельникова Н. С. Оценка противоопухолевого эффекта протонов, ионов гелия и углерода высоких энергий при облучении асцитных клеток аденокарциномы Эрлиха *ex vivo* // ДАН. Науки о жизни. 2025. Т. 525, № 1. С. 611–618.
32. Замулаева И. А., Матчук О. Н., Селиванова Е. И., Мосина В. А., Абрамова М. Р., Сабуров В. О., Корякин С. Н., Иванов С. А., Карпин А. Д., Борейко А. В., Чаусов В. Н., Кра-

- савин Е. А. Эффекты фракционированного действия протонного излучения в комбинации с 1- β -D-арабинофуранозилцитозином на мышиную меланому линии B16 *in vivo* // Письма в ЭЧАЯ. 2024. Т. 21, № 6(257). С. 1128.
33. Balakin V. E., Bazhan A. I., Alexandrov V. A., Chashurin V. I., Lunev P. A., Pryanichnikov A. A., Shemyakov A. E., Belikhin M. A., Shestopalov A. I. Updated Status of Protom Synchrotrons for Radiation Therapy // Proc. 27th Russ. Part. Accel. Conf. (RuPAC'2021), Alushta, Sept. 27 – Oct. 1, 2021. P. 120–123.
34. Миронов А. Н., Бунатян Н. Д., Васильев А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

Получено 15 мая 2026 г.