

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛЕНОЧНОЙ ДОЗИМЕТРИИ И МОДЕЛИРОВАНИЯ ГЛУБИННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОГЛОЩЕННОЙ ДОЗЫ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ КЛЕТОК МЫШИ НИЗКИМИ ДОЗАМИ ПРОТОНОВ НА ЦИКЛОТРОНЕ У-150

Смирнова О.Д., Лукьяшин В.Е., Семочкина Ю.П., Латушкин С.Т., Родина А.В., Москалёва Е.Ю.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
пл. Курчатова, 1, г. Москва, 123182, РФ; e-mail: smirnova0ksana@yandex.ru
Поступила в редакцию: 14.08.20

Аннотация. Изучена чувствительность культивируемых мезенхимальных стромальных стволовых клеток (МСК), полученных из костного мозга мыши, к облучению протонами с энергией 32 МэВ и относительная биологическая эффективность (ОБЭ) протонов в диапазоне низких доз. Выживаемость МСК после облучения оценивали по изменению количества клеток и их клоногенной активности. Дозиметрию протонного излучения проводили с использованием радиохромной пленки ЕВТЗ, которую подвергали облучению в тех же условиях, что и облучаемые клетки. Для этого образцы пленки размещали в аналогичных цилиндрических пробирках в культуральной среде, моделируя условия облучения суспензии клеток. Распределение энерговыделения протонов при прохождении пучка частиц через исследуемые образцы рассчитывали с использованием программы SRIM-2013-Pro. Показано, что как общее количество МСК, так и количество МСК, способных к пролиферации, снижается с увеличением дозы облучения протонами. При этом клетки, обладающие клоногенной активностью, более чувствительны к инактивации протонами, чем общая популяция облученных МСК. При сравнении чувствительности клоногенной активности МСК к облучению протонами и гамма-квантами, показано, что клетки в диапазоне низких доз (от 0,15 до 0,6 Гр) более чувствительны к действию протонов. При расчете ОБЭ протонов по полученным данным показано возрастание этого показателя в указанном диапазоне доз от 1,54 до 2,07.

Ключевые слова: Ускоренные частицы, протоны, линейная передача энергии, дозиметрия, дозиметрическая пленка ЕВТЗ, ОБЭ, относительная биологическая эффективность, гамма-излучение, мезенхимальные стволовые клетки, клоногенная активность.

Биологические эффекты ионизирующего излучения разных типов определяются величиной дозы и линейной передачей энергии (ЛПЭ) излучения на единицу пути частицы. Потоки фотонов и протонов принципиально различаются по своим профилям поглощения энергии: фотоны теряют энергию экспоненциально, причем более высокий уровень передачи энергии имеет место ближе к точке входа пучка. Напротив, протоны большую часть энергии при взаимодействии с тканью отдают только незадолго до полной остановки частиц в области, получившей название пика Брэгга, поскольку их средняя потеря энергии на протяжении трека обратно пропорциональна квадрату их скорости [1]. Эта особенность ускоренных протонов позволяет обеспечить при лучевой терапии поглощение основной части энергии частиц в зоне опухоли и, соответственно, обеспечивает меньшее повреждение нормальных тканей за её пределами.

Для сравнения повреждающего действия излучений разных типов используют величину относительной биологической эффективности (ОБЭ), которая определяется как отношение равноэффективных доз эталонного излучения к исследуемому. В качестве эталонного излучения при этом используется γ -излучение кобальта-60, или рентгеновское излучение с энергией 250 кэВ [2]. Сведения о величине ОБЭ протонного излучения нельзя считать однозначными. В лучевой терапии при использовании высокоэнергетического излучения принято считать, что ОБЭ протонов равна 1,1 [3]. При низкоэнергетическом излучении ОБЭ протонов изучена мало, хотя такому излучению могут подвергаться космонавты при дальних космических полетах. В настоящее время накапливаются данные, свидетельствующие о более высоких значениях ОБЭ при действии низкоэнергетического излучения протонов [4;5]. При этом важно отметить, что наиболее высокая величина ОБЭ ускоренных частиц регистрируется при низких дозах, а с увеличением дозы ОБЭ снижается.

Степень повреждения клеток при облучении, помимо дозы, зависит от вида ионизирующего излучения, особенностей облучаемых клеток и может различаться в зависимости от показателей, выбранных для оценки воздействия. Мезенхимальные стромальные стволовые клетки (МСК) играют важную роль в обеспечении регенерации тканей при различных типах повреждения, в том числе при радиационном воздействии [6;7]. Гамма-облучение в высоких дозах вызывает гибель МСК [8], а при низких дозах может приводить к изменению свойств этих клеток в облученных тканях [9]. Влияние низких доз протонного излучения на МСК не изучено, хотя эти клетки играют важную роль в поддержании кроветворения в костном мозге и стимуляции процессов регенерации в различных тканях.

В связи с этим целью настоящей работы стало исследование чувствительности культивируемых МСК, выделенных из костного мозга мыши, к облучению протонами с энергией 32 МэВ, и определение ОБЭ протонов в диапазоне низких доз. Для более точной дозиметрии протонного излучения одновременно и в одинаковых условиях проводили облучение цилиндрических пробирок с суспензией клеток и с радиохромной пленкой ЕВТЗ

в равном объеме культуральной среды, которые располагали вплотную друг к другу симметрично на оси облучения в пучке протонов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование МСК. Животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. МСК выделяли из костного мозга мышей линии C57BL/6 в возрасте 1-2 месяца, как описано ранее [8]. Костный мозг получали из большеберцовых костей путем промывания полости фосфатно-солевым буфером, содержащим 50 ед/мл гепарина и 25 мкг/мл гентамицина с помощью иглы 18G. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 200 г. Супернатант удаляли, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота и 50 мкг/мл гентамицина и переносили в культуральные флаконы 25 см² в плотности 40000 клеток/см² на 24 часа для прикрепления к пластиковой поверхности. Через 24 часа не прикрепившиеся клетки удаляли, прикрепившиеся клетки, которые составляли популяцию МСК, промывали 2 раза фосфатно-солевым буфером и культивировали до достижения субконфлюентного состояния в CO₂-инкубаторе, после чего пересеивали, используя раствор трипсин-ЭДТА, и использовали в экспериментах после 25-го пассажа.

Облучение клеток. Клетки в культуральной среде подвергали действию γ -излучения от источника кобальт-60 на сертифицированной установке «ГУТ-200М» (НИЦ Курчатовский институт) при комнатной температуре в дозе 0,1 Гр при мощности дозы 0,01 Гр/мин; а в дозах 1-6 Гр – при мощности дозы 0,75 Гр/мин. Облучение клеток протонами проводили в пучке изохронного циклотрона У-150 (НИЦ Курчатовский институт) с исходной кинетической энергией протонов 32 МэВ в режиме однократных импульсов длительностью по 400 мкс и токе 1-2 мкА. Образцы облучали в виде суспензии клеток в цилиндрических пробирках диаметром 5 мм при комнатной температуре.

Дозиметрия протонного излучения при облучении клеток. Для оценки доз, полученных МСК при облучении протонами, использовали дозиметрическую пленку GAFCHROMIC EBТ3 («Ashland ISP Advanced Materials», США), предназначенную для анализа низких доз излучения в соответствии с рекомендациями фирмы, так как ранее показано, что результаты пленочной дозиметрии полностью совпадают с данными дозиметрии, проводимой с использованием ионизационных камер [10]. Для получения абсолютного значения доз при облучении клеток протонами получали калибровочные кривые затемнения пленок EBТ3 при их γ -облучении в разных дозах на установке «ГУТ-200М» с источником кобальт-60. Сканирование всех пленок производили с использованием сканера Epson Perfection V19 не менее, чем через 24 часа после облучения. Условия сканирования: разрешение 600 dpi, все функции автокоррекции были отключены. Для анализа использовали красный канал. При анализе небольших фрагментов пленки после их облучения в пробирках с культуральной средой параллельно с облучением клеток денситометрию пленок проводили также при использовании спектрофотометра Shimadzu3600 UV-Vis-NIR («Shimadzu Corp.», Япония; Ресурсный центр оптической микроскопии и спектроскопии) при длине волны 638 нм. Глубинное распределение поглощенной дозы для протонов рассчитывали с использованием программы SRIM-2013-Pro [12] в приближении 1,5% дисперсии по энергии и углу рассеяния протонов.

Анализ клоногенной активности МСК. Выживаемость МСК после облучения оценивали по изменению клоногенной активности клеток. Для исследования клоногенной активности сразу после облучения контрольные и облученные клетки высаживали в 6-луночные культуральные платы в количестве 100 клеток/луночку для контрольных и γ -облученных МСК. При облучении протонами количество клеток увеличивали до 200 клеток/луночку для доз 0,3 и 0,4 Гр и до 400 клеток/луночку для 0,6 Гр.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из доступных решений для экспериментального детектирования распределения доз при использовании протонного пучка, как отмечено выше, является дозиметрия при помощи специальных радиохромных пленок. Такие пленки состоят из двух слоев полиэтилена, между которыми находится активный слой (маркерный краситель, стабилизаторы и другие компоненты, придающие пленке ее энергонезависимый отклик). Оптическая плотность таких пленок возрастает под воздействием ионизирующего излучения пропорционально дозе облучения в определенном дозовом диапазоне. Пленка EBТ3 является наиболее чувствительной в диапазоне доз 0,2-10 Гр, что позволяет ее использовать при работе с низкими дозами. На рисунке 1 приведена дозовая зависимость изменения оптической плотности пленки EBТ3 при действии γ -излучения кобальта-60.

Повышение оптической плотности пленки до 0,5 единиц регистрируется уже после облучения в дозе 0,5 Гр, что позволяет использовать пленку EBТ3 для анализа действия излучения в диапазоне низких доз, начиная от 0,2 Гр. В диапазоне от 0,2 до 1 Гр зависимость оптической пленки от дозы близка к линейной. При более высоких дозах в диапазоне 2-10 Гр увеличение оптической плотности пленки также соответствовало линейной зависимости от дозы, но с меньшим углом наклона прямой. Эта калибровочная кривая была использована для определения дозы протонов при облучении клеток.

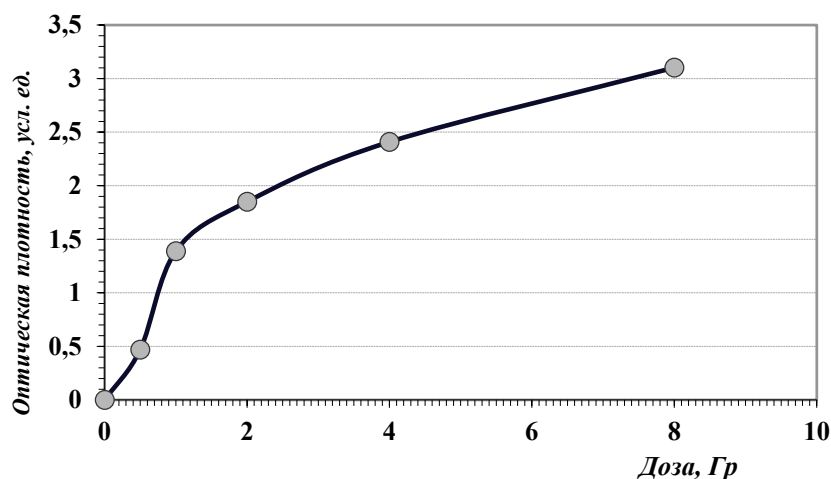


Рисунок 1. Калибровочный график для определения дозы протонного излучения по изменению оптической плотности пленки GAFCHROMIC EBT3 после γ -облучения. Денситометрия проведена на спектрофотометре Shimadzu3600 UV-Vis-NIR при 638 нм, оптическая плотность необлученной пленки вычтена

Для выбора корректного расположения образцов при одновременном облучении двух пробирок (с клетками и с радиохромной пленкой) в равных условиях предварительно анализировали равномерность пространственного распределения доз в зависимости от расстояния от оси коллимированного пучка протонов по изменению оптической плотности пленки EBT3. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

Как следует из представленных на рисунке 2 данных, равные условия облучения будут достигаться при расположении каждого из объектов на расстоянии не более 6 мм от центра пучка. Эти условия были выбраны в качестве стандартных при облучении клеток и радиохромных пленок в одинаковых цилиндрических пробирках с культуральной средой, которые для облучения фиксировали в специальном стенде в центре пучка симметрично относительно его оси для обеспечения одинаковых условий облучения.

Распределение энерговыделения протонов при облучении образцов рассчитывали с использованием программы SRIM-2013-Pro для числа испытаний порядка 10^6 протонов с энергией 32 МэВ. Полученное распределение представлено на рисунке 3.

Полученные данные о распределении ЛПЭ протонов при облучении образцов суспензии клеток и радиохромных пленок в культуральной среде в цилиндрических пробирках с внутренним диаметром 5 мм свидетельствуют о том, что облучение клеток происходило с энерговыделением, характерным для начала восходящей ветви кривой Брэгга.

Полученные результаты зависимости выживаемости клеток, оцениваемой по количеству клеток и их клоногенной активности, от дозы облучения протонами представлены на рисунке 4.

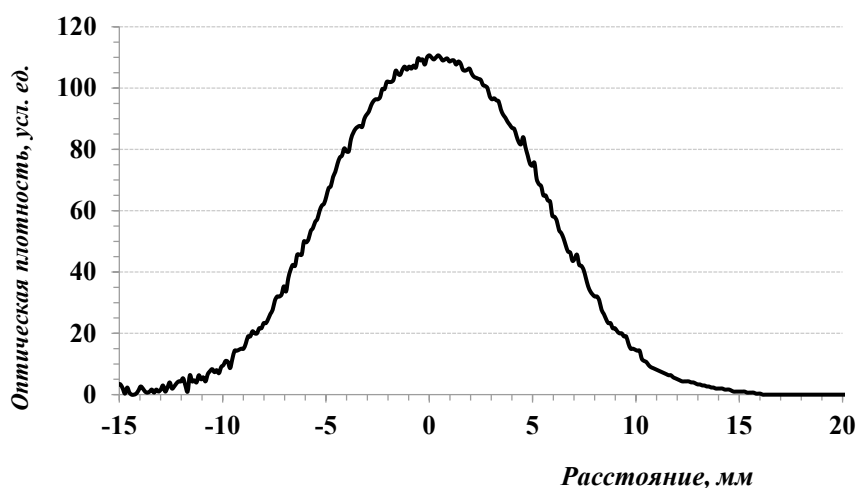


Рисунок 2. Распределение оптической плотности пленки EBT3 на оси облучения коллимированного пучка протонов в зависимости от расстояния от центра пучка

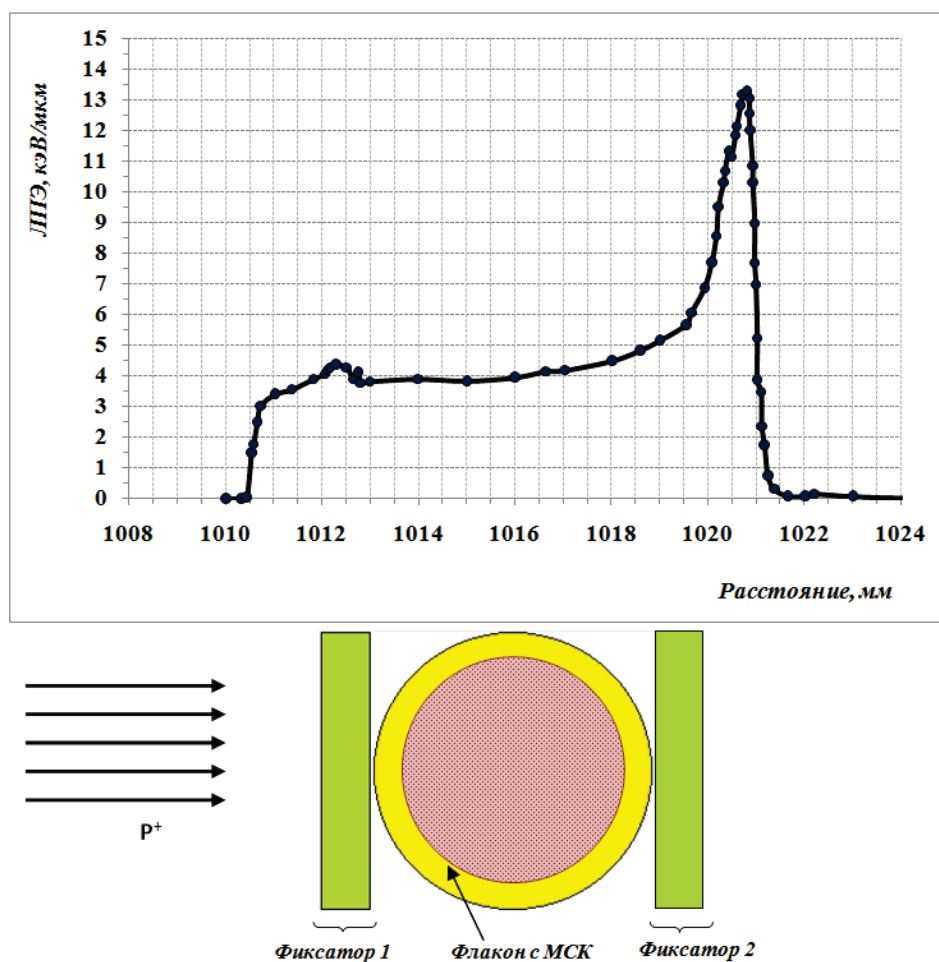


Рисунок 3. Модельный расчет ЛПЭ протонов с исходной кинетической энергией 32 МэВ на оси пучка в районе расположения облучаемых пробирок. Под графиком указано положение флакона с суспензией клеток и фиксаторов в пучке протонов p^+

Из представленных данных следует, что как общее количество МСК, так и количество МСК, способных к пролиферации, т.е. клеток, обладающих клоногенной активностью, снижается с увеличением дозы облучения протонами в выбранном диапазоне низких доз. При этом клетки, обладающие клоногенной активностью, оказались более чувствительны к инактивации протонами, чем общая популяция облученных МСК.

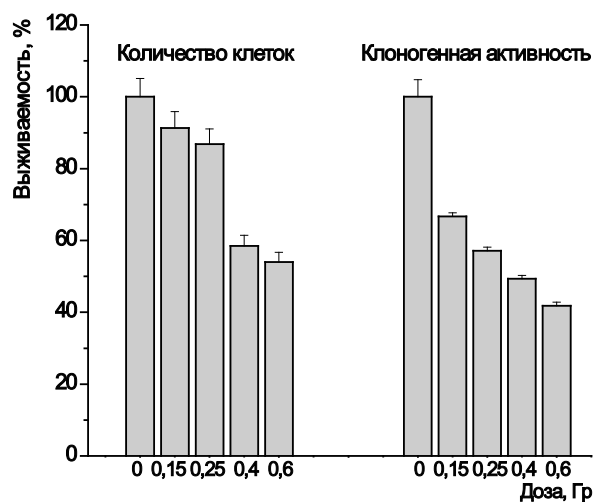


Рисунок 4. Выживаемость МСК после облучения протонами 32 МэВ, оцениваемая по количеству клеток и по их клоногенной активности

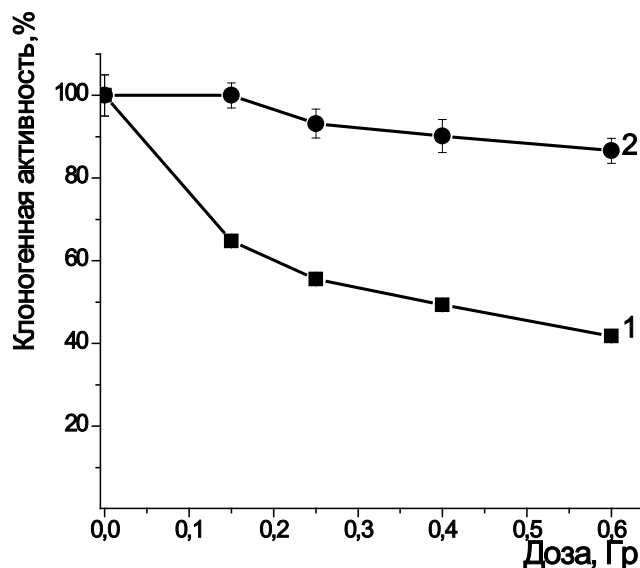


Рисунок 5. Зависимость изменения клоногенной активности МСК от дозы облучения протонами 32 МэВ (1) и дозы гамма-излучения кобальта-60 (2).

При сравнении чувствительности клоногенной активности МСК к облучению протонами и гамма-квантами, показано (рис. 5), что клетки в диапазоне низких доз – от 0,15 до 0,6 Гр более чувствительны к действию протонов. При расчете ОБЭ протонов по полученным данным показано возрастание этого показателя в указанном диапазоне доз от 1,54 до 2,07 (рис. 6).

Следует отметить, что при изучении ОБЭ гамма-нейтронного излучения в диапазоне от 0,5 до 4,0 Гр максимальное значение ОБЭ для МСК из костного мозга мыши, равное 5,5, наблюдали при дозе 0,5 Гр. При увеличении дозы гамма-нейтронного излучения до 2 Гр ОБЭ снижалась до 2,5, а при увеличении до 4,0 Гр – до 2,0 [13]. Поэтому можно полагать, что при более высоких дозах ОБЭ протонов также будет соответствовать более низким значениям. При облучении опухолевых клеток человека высокоэнергетическими протонами показано увеличение ОБЭ с увеличением ЛПЭ при их облучении соответственно в начальной части расширенного пика Брэгга и в его конечной части, когда ЛПЭ достигает максимального значения [14]. Авторами показано, что при увеличении ЛПЭ с 2,85 до 8,14 кэВ/мкм для 37% выживаемости радиочувствительных опухолевых клеток ОБЭ возрастала с 1,16 до 1,40, что коррелировало с более медленной репарацией двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках в этих условиях. При 10% выживаемости ОБЭ для этих клеток возрастала только с 1,06 до 1,24. Мы анализировали ОБЭ для диапазона доз, при которых сохраняется более высокий уровень клоногенной активности МСК, изменявшейся в зависимости от дозы протонов от 66,7 до 41,8%, а ОБЭ при этом составляла от 1,54 до 2,07 (рис. 6) при ЛПЭ протонов, равной 4,0 кэВ/мкм. Полученные нами более высокие значения ОБЭ протонов могут определяться как более низкой энергией использованного протонного пучка и значениями ЛПЭ, соответствующими восходящей ветви кривой Брэгга, так и появлением в этих условиях кластерных более медленно репарируемых ДР ДНК [15;16], а также особенностями самих МСК. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение биологических эффектов высоких доз ускоренных протонов с энергией 32 МэВ.

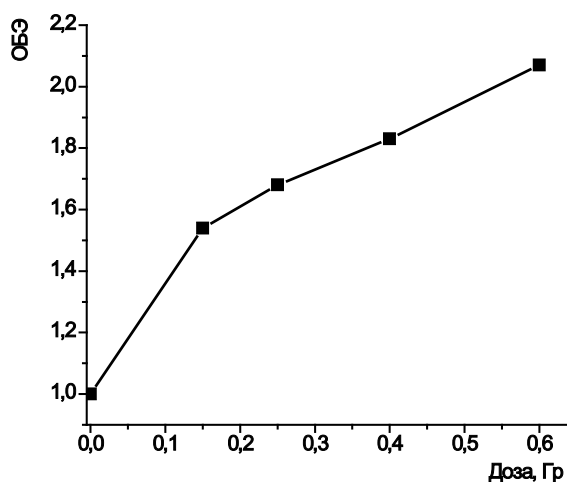


Рисунок 6. Зависимость изменения ОБЭ от дозы облучения МСК мыши протонами 32 МэВ.

Таким образом, на основе дозиметрии с использованием дозиметрической пленки GAFCHROMIC EBТ3 и модельных расчетов ЛПЭ протонов с изначальной исходной кинетической энергией 32 МэВ определены параметры облучения культивируемых клеток ускоренными протонами в диапазоне низких доз в области восходящей ветви пика Брэгга на циклотроне У-150. Показано значительно более высокое повреждающее действие низких доз ускоренных протонов с энергией 32 МэВ на нормальные клетки мыши, чем действие гамма-излучения.

Авторы выражают огромную благодарность ведущему инженеру отдела радиационных исследований материалов Курчатковского ядерно-физического комплекса Семенову Евгению Владимировичу за консультации и помощь в написании статьи.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ №1363 от 25.06.2019 г.).

Список литературы / References:

1. Tommasino F., Durante M. Proton radiobiology. *Cancers*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 353-381.
2. Джойнер М.С., Ван дер Когель О.Дж. *Основы клинической радиобиологии. Пер. с англ.* М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013, 600 с. [Joiner M., van der Kogel A., Eds., *Basic Clinical Radiobiology Fourth Edition*, Hodder Arnold Publication, London, 391 p. (In Russ.)]
3. Jones B. Proton radiobiology and its clinical implications. *Ecancer*, 2017, vol. 11, p. 777.
4. Ворожцова С.В., Иванов А.А. Эффекты поражения и постлучевой репарации хромосомного аппарата клеток эпителия роговицы мышей после облучения протонами с энергией 25 МэВ. *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 2012, т. 46, № 4, с. 27-31. [Vorozhtsova S.V., Ivanov A.A. Effects of damage and post-radiation geragation of cornea epithelium cells chromosomal apparatus in mice following irradiation by protons with the energy of 25 MeV. *Aerospace and environmental medicine*, 2012, vol. 46, no. 4, pp. 27-31. (In Russ.)]
5. Хвостунов И.К., Пятенко В.С., Шепель Н.Н., Коровчук О.Н., Голуб Е.В., Жиронкина А.С, Хвостунова Т.И, Лычагин А.А. Анализ хромосомных aberrаций в клетках млекопитающих при воздействии различных видов ионизирующего излучения. *Радиация и риск*, 2013, т. 22, № 4, с. 43-59. [Khvostunov I.K., Pyatenko V.S., Shepel N.N., Korovchuk O.N., Golub E.V., Zhironkina A.S., Khvostunova T.I., Lychagin A.A. Analysis of chromosome aberrations induced in mammalian cells after exposure to different types of ionizing radiation. *Radiation and risk*, 2013, vol. 22, no. 4, pp. 43-59. (In Russ.)]
6. Leibacher J., Henschler R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cell Res. Therapy*, 2016, vol. 7, no. 7, pp.1-12.
7. Gao Z., Zhang Q., Han Y., Cheng X., Lu Y., Fan L., Wu Z. Mesenchymal stromal cell-conditioned medium prevents radiation-induced small intestine injury in mice. *Cytotherapy*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 267-73.
8. Москалева Е.Ю., Семочкина Ю.П., Родина А.В., Чукалова А.А., Посыпанова Г.А. Влияние облучения на мезенхимальные стволовые клетки костного и головного и мозга мыши и их способность индуцировать опухоли. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2017, т. 57, № 3, с. 245-256. [Moskaleva E.Y., Semochkina Y.P., Rodina A.V., Chukalova A.A., Posypanova G.A. *Radiation biology. Radioecology*, 2017, vol. 57, no. 3, pp. 245-256. (In Russ.)]
9. François S., Bensidhoum M., Mousieddine M., Mazurier C., Allenet B., Semont A. et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells*, 2006, vol. 24, pp. 1020-1019.
10. Chung H., Lynch B., Samant S. High-precision GAFCHROMIC EBT film-based absolute clinical dosimetry using a standard flatbed scanner without the use of a scanner non-uniformity correction. *J. Appl Clin Med Phys.*, 2010, vol. 11, no. 2, pp. 101-115.
11. Kirby D., Green S., Palmans H., Hugtenburg R., Wojnecki C., Parker D. LET dependence of GafChromic films and an ion chamber in low-energy proton dosimetry. *Phys. Med. Biol.*, 2010, vol. 55, pp. 417-433.
12. Ziegler J.F. SRIM-2003. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research: Section B*, 2004, vol. 219-220, pp. 1027-1036.
13. Семочкина Ю.П., Родина А.В., Москалева Е.Ю., Жорова Е.С., Сапрыкин В.П., Арзуманов С.С., Сафронов В.В. Злокачественная трансформация мезенхимальных стволовых клеток из разных тканей мыши после смешанного гамма-нейтронного облучения in vitro. *Мед. радиология и радиационная безопасность*, 2019, т. 64, № 1, с. 5-14. [Semochkina Yu.P., Rodina A.V., Moskaleva E.Yu., Zhorova E.S., Saprykin V.P., Arzumanov S.S., Safronov V.V. Malignant transformation of mesenchymal stem cells from different mouse tissues after mixed gamma-neutron irradiation in vitro. *Med. radiology and radiation safety*, 2019, vol. 64, no. 1, pp. 5-14. (In Russ.)]
14. Hojo H., Dohmae T., Hotta K., Kohno R., Motegi A., Yagishita A., Makinoshima H., Tsuchihara K., Akimoto T. Difference in the relative biological effectiveness and DNA damage repair processes in response to proton beam therapy according to the positions of the spread out Bragg peak. *Radiat Oncol.*, 2017, vol. 12, p. 111.
15. Oeck S., Szymonowicz K., Wiel G., Krysztofiak A., Lambert J., Koska B., Iliakis G., Timmermann B., Jendrossek V. Relating Linear Energy Transfer to the Formation and Resolution of DNA Repair Foci After Irradiation with Equal Doses of X-ray Photons, Plateau, or Bragg-Peak Protons. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19, p. 3779.
16. Ray S., Cekanaviciute E., Lima I., Sørensen B., Costes S. Comparing Photon and Charged Particle Therapy Using DNA Damage Biomarkers. *Int J Particle Ther.*, 2018, vol. 5, no. 1, pp. 15-24.

USING OF FILM DOSIMETRY AND SIMULATION OF THE DEPTH DISTRIBUTION OF THE ABSORBED DOSE AT THE IRRADIATION OF MOUSE CELLS WITH LOW DOSES OF PROTONS ON THE U-150 CYCLOTRON

Smirnova O.D., Lukyashin V.E., Semochkina Yu.P., Latushkin S.T., Rodina A.V., Moskaleva E.Yu.

National research center "Kurchatov Institute"

Kurchatov Pl., 1, Moscow, 123182, Russia; e-mail: smirnova0ksana@yandex.ru

Abstract. The sensitivity of cultured mesenchymal stromal stem cells (MSC) obtained from mouse bone marrow to irradiation with 32 MeV protons and the relative biological efficiency (RBE) of protons in the low dose range were studied. The survival of MSCs after irradiation was assessed by the change in the number of cells and in their clonogenic activity. Dosimetry of proton radiation was performed using an EBT3 radiochromic film, which was irradiated under the same conditions as the irradiated cells. For this, the film samples were placed in similar cylindrical tubes in the culture medium, simulating the conditions for irradiation of the cell suspension. The distribution of the energy release of protons during the passage of a particle beam through the samples under study was calculated using the SRIM-2013-Pro software. It has been shown that both the total number of MSCs and the number of MSCs capable of proliferation decrease with an increase in the proton irradiation dose. Moreover, cells with clonogenic activity are more sensitive to inactivation by protons than the general population of irradiated MSCs. When comparing the sensitivity of the clonogenic activity of MSCs to irradiation with protons and gamma rays, it was shown that cells in the range of low doses (from 0.15 to 0.6 Gy) are more sensitive to the action of protons. When calculating the RBE of protons from the data obtained, an increase in this indicator was shown in the indicated dose range from 1.54 to 2.07.

Key words: *accelerated particles, protons, linear energy transfer, dosimetry, dosimetry film EBT3, RBE, relative biological effectiveness, gamma radiation, mesenchymal stem cells, clonogenic activity.*