

Анализ клеточной гибели и пролиферативной активности клеточных культур при облучении протонами в режиме флэш

В.В. Мартынова,^{1,*} С.В. Акулиничев,¹ И.А. Яковлев¹

¹Институт ядерных исследований РАН (ИЯИ РАН), лаборатория медицинской физики
Россия, 117312, Москва, В-312, проспект 60-летия Октября, 7а

(Поступила в редакцию 30.09.2024; после доработки 26.11.2024; подписана в печать 06.12.2024)

Изучение биологических эффектов воздействия ускоренных протонов со сверхвысокой мощностью дозы в пике Брэгга и вне его на опухолевые и нормальные клеточные линии необходимо для понимания последствий этого воздействия и выбора оптимальных доз и режимов для дальнейшего использования в радиотерапии опухолей. В настоящей работе облучались клетки аденокарциномы толстой кишки человека (HT-29) и нормальные мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека — фибробласты (ADSC). Облучение проводилось с использованием сильноточного линейного ускорителя протонов ИЯИ РАН, который позволяет варьировать энергию в диапазоне 70–230 МэВ. Доза подводилась в трех режимах: конвенциональный режим (мощность дозы $\dot{D} < 1$ Гр/с), флэш-режим ($\dot{D} \sim 100$ Гр/с) и одноимпульсный флэш-режим ($\dot{D} > 10^4$ Гр/с, сплэш от single-pulse flash) в области модифицированного пика Брэгга. Для анализа клеточной гибели производилась окраска йодистым пропидием и аннексином. Для пролиферативного потенциала воспроизводился EdU-тест. Через 24 ч обнаружили увеличение количества апоптотических клеток HT-29 во всех режимах, для фибробластов наблюдали относительное увеличение количества некротических клеток при конвенциональном режиме облучения при сравнении с другими режимами дозы. Через 48 ч при всех режимах облучения наблюдалась тенденция уменьшения количества некротических клеток HT-29 в зависимости от дозы при флэш/сплэш режимах и низкий уровень таковых для фибробластов. Количество синтезирующих ДНК клеток к 120 ч существенно уменьшалось при всех дозах и режимах облучения. Кривые для флэш- и сплэш- режимов облучения были практически параллельны. Необходимы дальнейшие исследования с привлечением более широких спектров клеточных линий и доз.

PACS: 87.64.-t. УДК: 53:047, 577:34

Ключевые слова: флэш-терапия, протонная терапия, клеточная гибель, пролиферативный потенциал.

DOI: [10.55959/MSU0579-9392.80.2520204](https://doi.org/10.55959/MSU0579-9392.80.2520204)

ВВЕДЕНИЕ

Основная цель лучевой терапии (ЛТ) — уничтожить или замедлить рост опухоли при условии сохранения нормальных тканей. Эффективность лечения зависит от ряда факторов, включая тип излучения, суммарную дозу, фракционирование дозы и т.д. [1]. В настоящее время активно исследуются радиобиологические эффекты и механизмы ответа опухолевых клеток на ЛТ. Это важно для разработки новых терапевтических стратегий и реализации оптимальных планов лечения у пациентов с онкологическими заболеваниями [2]. Известно, что разные опухоли демонстрируют разную чувствительность к ЛТ. Радиотерапия опухолей адронными пучками становится все более востребованной, благодаря конформности энергосодержания (в пике Брэгга), падающего на нормальные ткани вблизи опухоли. В частности, при облучении протонами в области за пиком Брэгга практически не происходит выделение энергии [3], что поз-

воляет сохранять нормальные ткани. Развитие исследований по радиационной токсичности при подведении дозы облучения со сверхвысокой мощностью получило второе рождение в связи с расширением применения ускорителей элементарных частиц (электроны, протоны), заряженных ионов и, конечно, мощных лазеров рентгеновского излучения в радиотерапии опухолей. За перспективной радиотерапией со сверхвысокой мощностью подведения дозы в 2010-е годы закрепился термин FLASH-радиотерапии (флэш-терапии), а сохранения здоровых тканей при таком режиме подведения дозы получило название FLASH-эффекта (флэш-эффект). Из анализа литературы видно, что флэш-эффект ($\dot{D} > 40$ Гр/с) может как снизить токсичность для нормальных тканей, так и повысить эффективность уничтожения опухоли [4]. В настоящее время широко проводятся исследования на нормальных и опухолевых клеточных линиях и животных [4–8]. После успешного излечения ускоренными электронами во флэш-режиме первого пациента с радиорезистентной кожной лимфомой [9] флэш-радиотерапия начала проходить клинические испытания, не имея достаточных представлений о механизмах флэш-эффекта [10]. В целом данные исследований

* E-mail: donvaleriia@gmail.com

в настоящее время указывают на три потенциальных механизма повышения вероятности контроля над опухолью при возможности снижения осложнений в нормальных тканях во время флэш-облучения частицами. В частности, щадящие эффекты для нормальных тканей возникают из-за быстрого истощения кислорода, меньшего поражения ДНК и дифференцированного иммунного ответа. Авторы отмечают, что требуются дальнейшие исследования *in vivo* и *in vitro* ввиду определенной осторожности при клинической интерпретации полученных к настоящему времени результатов [4]. Разнообразие источников облучения, применяемых доз, адекватной дозиметрии дает широкие возможности для исследований, в том числе на клеточных линиях.

Настоящая работа посвящена изучению биологических эффектов, связанных с облучением протонами во флэш-режиме опухолевых и нормальных клеток в модифицированном пике Брэгга (МПБ). Были использованы клетки HT-29 — колоректальная аденокарцинома человека и в качестве нормальных клеток — мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека фибробласты ADSC. Облучение проводилось с использованием сильноточного линейного ускорителя протонов ИЯИ РАН, который позволяет варьировать энергию в диапазоне 70–230 МэВ, частоту импульсов 1–100 Гц, длительность импульсов 0.3–100 мкс при токе протонов от 0.1 мкА до 10 мА. Количество протонов в отдельном импульсе пучка может достигать 10^{13} частиц. Ускоритель позволяет облучать в разных режимах: одноимпульсный флэш-режим (сокращенно назван сплэш от single-pulse-flash) при $\dot{D} > 10^4$ Гр/с, «обычный» флэш-режим при $\dot{D} \sim 100$ Гр/с и конвенциональный режим при $\dot{D} < 1$ Гр/с [11].

Одним из подходов при исследовании флэш-эффекта на клетках является анализ индукции апоптоза опухолевых клеток. Апоптоз — регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, в результате которой клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной [12]. Функциональная роль апоптоза — поддержание тканевого гомеостаза, выведение поврежденных, дефектных или мутантных, отработавших и нефункциональных клеток, противовирусная и противоопухолевая защита. По своей биологической роли апоптоз противоположен первой фазе клеточного цикла — пролиферации [13, 14].

Цель работы — оценить эффекты флэш-воздействия протонов (развитие апоптоза, некроза и уменьшение синтеза ДНК) в клетках HT-29 и фибробластах в разные сроки после их облучения в пике Брэгга с разной мощностью дозы. Эти результаты могут быть полезны для понимания биологической природы флэш-эффекта и выработки рекомендаций по его безопасному и эффективному применению.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Клетки

Объектами исследования служили клеточные культуры: колоректальная аденокарцинома человека — HT-29 (получены из РНЦРР, г. Москва). В качестве нормальных клеток были взяты мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека — фибробласты (ADSC). Фибробласты были получены из «Коллекции клеточных культур» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (г. Москва). Данные клеточные линии культивировались при следующих стандартных условиях в CO_2 -инкубаторе: температура 37°C , концентрация CO_2 — 5%. Для полной клеточной среды использовалась смесь DMEM («ПанЭко») с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Biosega») и глутамина («ПанЭко»). В качестве антибиотика использовали пенициллин 5000 Ед/мл и стрептомицин 5000 мкг/мл («ПанЭко»).

1.2. Облучение

Принцип работы протонной лучевой установки, использованной в данной работе, основан на методе пассивного формирования распределения дозы за счет рассеяния протонов в формирующих устройствах. Установка включает систему двойного рассеяния, состоящую из первичного рассеивателя в виде тонкой медной пластины и фигурного вторичного рассеивателя с компенсатором поглощения энергии, и модулятор энергии в виде гребенчатого фильтра. Первая пара формирующих устройств создает широкий однородный пучок протонов. Модулятор энергии формирует модифицированный пик Брэгга, который позволяет облучать образцы замедленными протонами в конце их пробега, где возрастает линейная передача энергии и биологическая эффективность облучения. Система формирования создает в водном фантоме однородное дозовое распределение, которое накрывает несколько микропробирок с клетками (рис. 1). Общая область однородности дозы МПБ с точностью $\pm 5\%$ в водном фантоме составляет около 10 см в поперечном измерении и 5 см по глубине. В данном эксперименте использовались пучки протонов с энергией 160 МэВ на выходе из ускорителя [15]. В нашей установке протонной терапии предусмотрено облучение мишеней фиксированным горизонтальным пучком с максимальной апертурой 10 см. Доза подводилась в трех разных режимах: конвенциональный режим ($\dot{D} < 1$ Гр/с), флэш-режим ($\dot{D} \sim 100$ Гр/с) и одноимпульсный сплэш-флэш ($\dot{D} > 10^4$ Гр/с). Во всех режимах мишени размещались в области МПБ.

Для точного позиционирования облучаемых биологических образцов в области МПБ в начале эксперимента использовался стандартный водный фантом MP-3 (РТW, Германия), в котором дистанци-

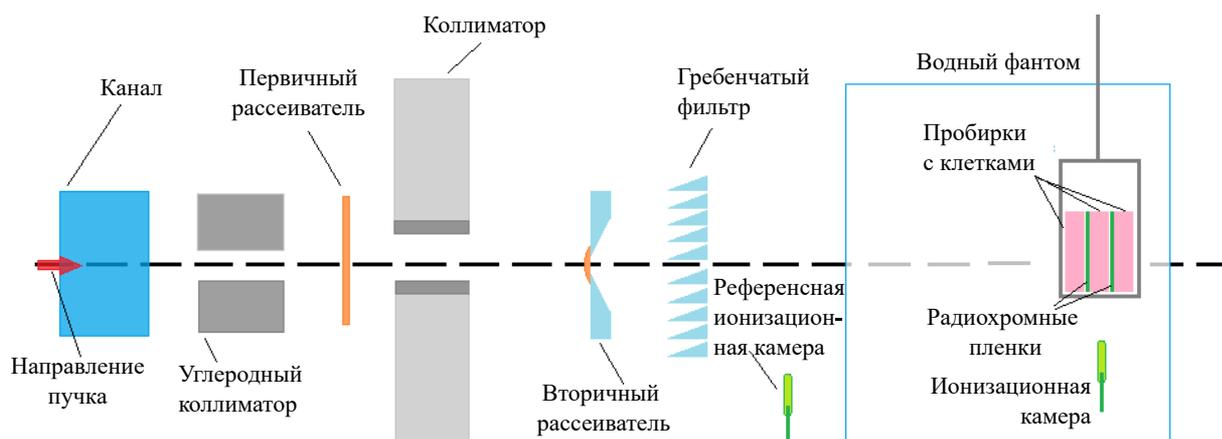


Рис. 1. Схема облучения пробирок с клетками на протонной установке ИЯИ РАН

онно перемещалась каретка с ионизационной камерой. После определения точных координат МПБ в привязке к геодезии лучевой установки облучение биологических образцов проводилось в водном фантоме собственного изготовления, имеющем на порядок меньший объем. Это позволило значительно сократить время ожидания охлаждения наведенной радиоактивности воды. Для определения подведенной дозы между рядами пробирок фиксировался детектор из радиохромной плёнки ЕВТ-ХД. Для контроля фактического положения МПБ в воде малого фантома использованы пленки ЕВТ-ХД, размещенные в воде фантоме вдоль пучка. Среднеквадратичное отклонение по областям радиохромных пленок, соответствующих местоположениям пробирок, составляет 3–5% от представленного значения. В результате анализа полученного таким образом продольного профиля МПБ контролировалось оптимальное положение штатива с пробирками при облучении [16].

При планировании эксперимента мы старались добиться дозы в 10 Гр во всех режимах. В связи с трудностями одномоментной дозиметрии во флэш-режиме и по опыту прошлых экспериментов были подобраны параметры пучка чтобы достичь дозы 10 Гр во всех режимах. Доза 10 Гр была выбрана с учетом данных прошлого эксперимента, где были построены графики доза–эффект для разных культур клеток [15].

Перед облучением клеточный монослой снимался 0.05%-м трипсином и производился подсчет клеток в камере Горяева. Облучение проводилось в микропробирках объемом 1.7 мл с клетками 6×10^5 кл/мл в питательной среде. Для каждой экспериментальной точки использовалось не менее 3 пробирок с клетками одной культуры. Пробирки с клетками помещались в специальный штатив, который дистанционно опускался в водный фантом для облучения и поднимался сразу после облучения. Длительность экспозиции при комнатной температуре (22°C) составляла 15 мин без перемешивания. При таких условиях основная часть клеток начи-

нала оседать на дно пробирки, что удобно для облучения в МПБ. После облучения клетки рассаживали в 96-луночные планшеты с концентрацией 5×10^4 кл/мл с полной средой с добавлением ЭТС. Сразу после облучения клетки рассеивали в планшеты и инкубировали в CO₂-инкубаторе до начала анализа в указанные сроки.

1.3. Анализ клеточной гибели

Окрашивание апоптотических и некротических клеток проводилось с помощью красителей аннексин V и йодистый пропидий («Люмипроб», РФ). Аннексин связывается со сложным липидом-фосфатидилсеринем (ФС) [17, 18]. В нормальных клетках ФС содержится только с внутренней стороны плазматической мембраны. Во время апоптоза мембранная асимметрия исчезает, ФС перемещается на наружную сторону мембраны и становится доступным для связывания флуоресцентно меченным аннексином. Йодистый пропидий — непроницаемый сквозь плазматическую мембрану ДНК-краситель. При сочетании двух красителей можно различать популяции нормальных апоптотических, и некротических клеток на основе целостности мембраны. Данный метод позволяет различать клетки в стадии раннего апоптоза (Анн+, ПР-), позднего апоптоза (Анн+, ПР+) и некроза (Анн-, ПР+). Красители добавлялись в лунки планшета и инкубировались 15 мин. Далее через 24 и 48 ч проводился анализ на флуоресцентном микроскопе Nexcore NIB620 (Китай) при длине волны 485 нм для аннексина и 525 нм для йодистого пропидия.

1.4. Оценка пролиферативного потенциала

В основе EdU-теста лежит использование флуоресцентного красителя EdU (5-этил-2'-дезоксинуридин) («Люмипроб», РФ), который способен встраиваться в ДНК делящихся

клеток. Клетки, находящиеся в состоянии покоя или подготовки к делению, не будут включать EdU в свою ДНК. Таким образом, при облучении образца лазером флуоресцентного микроскопа с определённой длиной волны можно увидеть только те клетки, которые находятся в S-фазе клеточного цикла, во время которой происходит репликация ДНК. Затем с помощью клик-химической реакции в присутствии медного катализатора можно пометить ДНК дочерних клеток, содержащую этилиновые фрагменты, азидами флуоресцентных красителей. Это позволяет определить, какие клетки активно делятся, и изучить процессы пролиферации и дифференцировки клеток [19, 20]. Контрольными точками после облучения были выбраны первые пять суток. Смесь EdU и DMEM добавлялась в лунки и инкубировалась 3 ч. Далее материал фиксировался раствором параформальдегида. После этого добавлялась смесь медного катализатора и азид 488 и проводилась инкубация в течение 12 ч. Для визуализации клеточных ядер в лунку добавлялся флуоресцентный краситель DAPI («Люмипроб», РФ). Анализ проводился на флуоресцентном микроскопе при длине волны 485 нм для EdU и 365 нм для DAPI.

1.5. Обработка результатов

Каждая экспериментальная точка с конкретной дозой и режимом была выполнена в 3 повторениях, вычисляли среднее и стандартное отклонение. Снимки, полученные с микроскопа, анализировались с помощью программы ImageJ 1.53, графики — OriginPro 2018. Статистический анализ проводился с использованием программного пакета Statistica 12. Данные флуоресцентной микроскопии представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Статистическая значимость определялась с помощью анализа ANOVA. Межгрупповые различия рассматривали как статистически значимые при $p < 0.05$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2, 3 представлен процент клеток, окрашенных в разных комбинациях аннексином и йодистым пропидием через 24 ч после облучения в трех режимах: конвенциональный (конв), стандартный флэш (фл) и одноимпульсный флэш (спл). Для клеток HT-29 (рис. 2) видно увеличение уровня позднего апоптоза (Анн+, Пр+) во всех режимах. Также видно отсутствие существенной разницы для опухолевых клеток между флэш- и одноимпульсным флэш-режимами, возможно из-за большой примененной дозы. Для фибробластов (рис. 3) наблюдалось увеличение некроза (Анн-, Пр+) в конвенциональном режиме. При этом регистрировался минимальный (близкий к нулю) уровень апоптоза и некроза у фибробластов в одноимпульсном флэш-

режиме (сплэш) и стандартном флэш. Следует отметить, что для конвенционального режима была использована и большая доза — 13.2 Гр по сравнению с интервалом 8.6–10.5 Гр для других режимов. Так что необходимы дальнейшие исследования для подбора оптимальных доз.

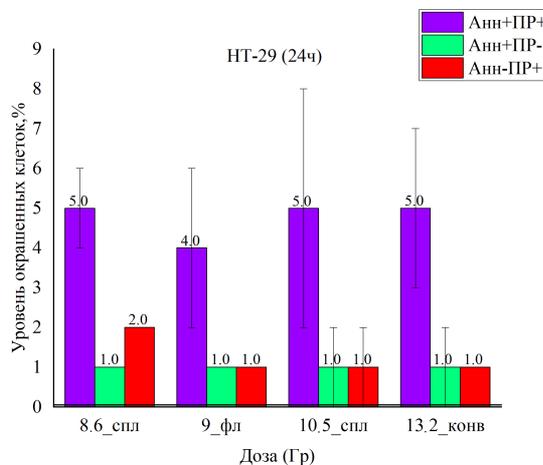


Рис. 2. Сравнение типов клеточной гибели HT-29 в трех режимах: конвенциональный (конв), стандартный флэш (фл) и одноимпульсный флэш (спл)

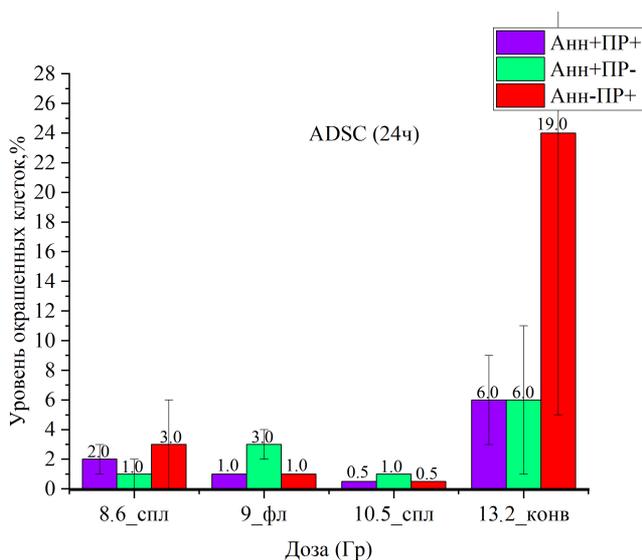


Рис. 3. Сравнение типов клеточной гибели фибробластов (ADSC) в трех режимах: конвенциональный (конв), стандартный флэш (фл) и одноимпульсный флэш (спл)

К 48 ч наблюдалось отсутствие окрашивания клеток аннексином и наличия апоптоза. Поскольку клеточный некроз характеризуется разрушением клеточных мембран и высвобождением клеточного содержимого во внеклеточное пространство, то их невозможно было зарегистрировать через 48 ч. Тенденция уменьшения количества некротических клеток HT-29 в зависимости от дозы при флэш/сплэш

режимах (рис. 4) и низкий уровень таковых для фибробластов может свидетельствовать о слишком большой примененной дозе и невозможности регистрировать некротические клетки через 48 ч вследствие их исчезновения из-за повреждений клеточных мембран или наличия лишь их следов, не поддающихся определению.

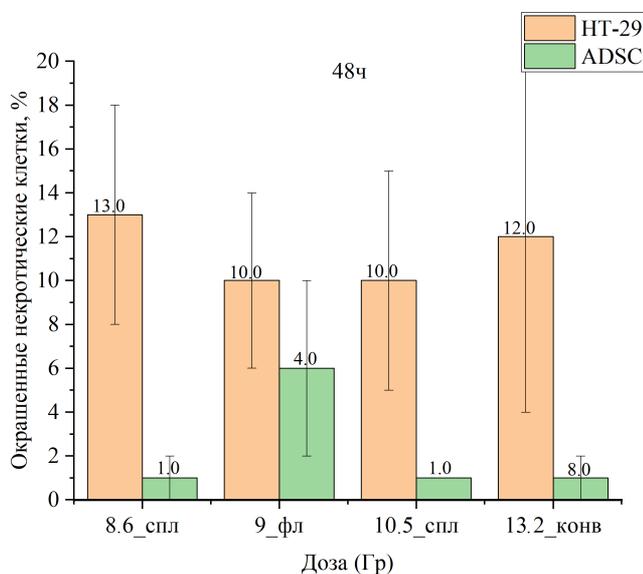


Рис. 4. Сравнение уровня некроза через 48 ч для HT-29 и фибробластов в трех режимах: конвенциональный (конв), стандартный флэш (фл) и одноимпульсный флэш (спл)

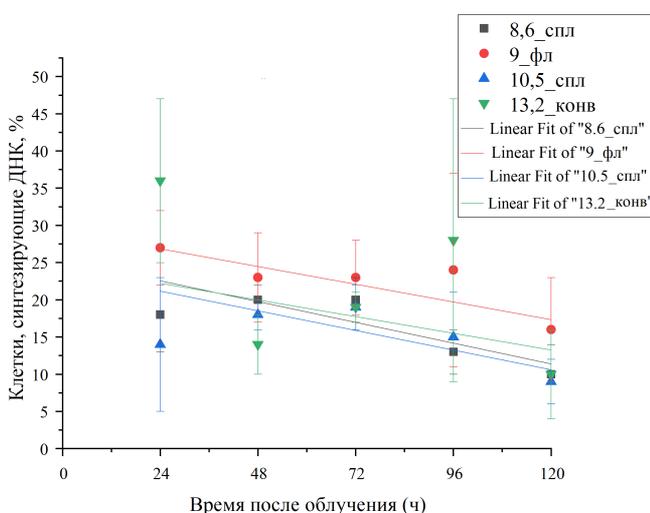


Рис. 5. Изменение количества клеток HT-29 синтезирующих ДНК в течение 5 суток после облучения в разных режимах и дозах

На рис. 5 представлены тренды количества клеток HT-29, включивших в состав своей ДНК EdU. Видно, что количество синтезирующих ДНК клеток к 120 ч существенно уменьшается при всех режимах облучения. Кривые для флэш- и сплэш-

режимов облучения были практически параллельны. Статистической разницы количества клеток в разные сроки после облучения между флэш- и сплэш-режимами при исследованных сравнимых дозах (примерно 8–9 Гр) не наблюдали. При большей дозе для конвенционального режима (примерно 13 Гр) наблюдался и больший угол наклона. Однако представленные данные следует рассматривать как предварительные, необходимы дальнейшие исследования с использованием разных доз и более широкого спектра клеточных линий для понимания различий между использованными режимами.

3. ОБСУЖДЕНИЕ

В основном ранние фундаментальные исследования, посвящённые изучению метода флэш-терапии, проводились в лабораторных условиях (*in vitro*) и результаты этих исследований значительно отличаются от результатов исследований, проведённых на живых организмах (*in vivo*) [21].

Микропучок ионов SNAKE на тандемном ускорителе в Мюнхене использовался для прямого сравнения импульсного и непрерывного пучка протонов 20 МэВ, который доставлял дозу 3 Гр в монослой клеток HeLa в течение < 1 нс или 100 мс соответственно. В данном эксперименте наблюдалось существенное увеличение уровня клеточной гибели опухолевых клеток примерно в 4 раза через 24 ч после облучения и примерно в 10 раз через 48 ч в обоих режимах облучения. При исследованных здесь мощностях доз, которые, как ожидается, соответствуют мощностям при лучевой терапии с использованием лазерных частиц, ОБЭ импульсного и (обычного) непрерывного режимов облучения существенно не различаются. [22]. В нашем исследовании также наблюдается существенное увеличение уровня апоптотических клеток HT-29 во всех режимах облучения (рис. 2). С критериями клеточной гибели неразрывно связано определение выживаемости клеток, что для культивируемых клеточных культур *in vitro* оценивается, как правило, по критерию образования колоний (клоногенный тест). Однако в большинстве исследований не было обнаружено различий в скорости образования клеточных колоний между облучением в режиме флэш и конвенциональным режимом [21]. В исследовании Auer S et al., 2011 также отсутствовала разница в колониеобразовании клеток после облучения протонами микропучком в импульсном режиме по сравнению с непрерывным режимом [22]. Выживаемость определяется успешностью репарационных процессов в пострадиационный период, что хорошо соответствует уровню синтеза ДНК. В нескольких исследованиях были продемонстрированы противоречивые результаты. Так, в экспериментах Beddok et al, 2017 при облучении ускоренными электронами опухолевых клеток A549 в дозах 2, 4, 6, 8 и 10 Гр в обоих режимах не наблюдалось стати-

стически значимых различий между флэш- и конвенциональными режимами облучения по критериям жизнеспособности, определяемой МТТ-тестом, клоногенным тестом и по количеству двунитевых разрывов ДНК (γ H2AX-фокусы) [23]. В исследовании Fouilla de et al., 2020 [24] обнаружили, что флэш-облучение клеток *in vitro* электронами в дозе 5.2 ± 0.2 Гр минимизирует повреждение ДНК (фокусы 53BP1, но не γ H2AX-фокусы) и реакции выживания нетрансформированных фибробластов легких человека (MRC5 и IMR-90). Напротив, реакция опухолевых клеток A549 по критерию образования фокусов 53BP1 была индифферентной к модальности облучения, что согласуется с ранее полученными данными Beddok et al., 2017 [23, 24]. Облучение в дозе 3 Гр протонами (20 МэВ) опухолевых клеток HeLa лазерным ускорителем протонов Мюнхенского тандемного ускорителя Университета Людвига-Максимилиана приводит к генотоксическому стрессу (маркер двунитевых разрывов ДНК — γ H2A.X) при облучении во флэш-режимах [22]. Поскольку ДНК-репарационные процессы характеризуются синтезом ДНК, то в наших экспериментах был оценен уровень включения EdU в синтезируемую ДНК в пострадиационном периоде. Снижение включения EdU указывает на высокий уровень генотоксического стресса в облученных клетках, развивающийся во времени (рис. 5). Примечательно, что кривые флэш- и сплэш-облучения практически параллельны, что может свидетельствовать о схожих механизмах воздействия флэш- и одноимпульсного флэш-облучения.

Несмотря на то, что исследования на лабораторных животных более близки для их интерпрета-

ции в отношении человека и проводятся в последнее время на различных животных моделях (грызуны, рыбки Данио, кошки, свиньи) [25–29], требуются дальнейшие исследования не только *in vivo*, но и *in vitro* ввиду определенной осторожности при клинической интерпретации полученных к настоящему времени результатов [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Через 24 ч после облучения обнаружена тенденция к повышению уровня позднего апоптоза в интервале доз 8.6–10.5 Гр у опухолевых клеток HT-29, облученных в режимах флэш и сплэш по сравнению с клетками HT-29, облученными в конвенциональном режиме с дозой 13.2 Гр.

Через 48 ч после облучения регистрируется некроз в нормальных фибробластах и опухолевых HT-29 клетках.

При одноимпульсном флэш-/флэш-облучении в пике Брэгга наблюдаются практически параллельные тренды изменения количества делящихся клеток.

Авторы благодарят и.о. зав.лаб. ИТЭБ РАН канд. биол. наук Е.А. Кузнецову за помощь в подготовке рукописи и ценные замечания, ст. науч. сотрудника ИТЭБ РАН канд. биол. наук С.И. Глухова за налаживание теста EdU в ЛМФ ИЯИ РАН.

Данная работа была поддержана грантом РНФ (№ 24-15-00040 «Разработка ядерно-физических и радиобиологических методов протонной флэш-терапии»).

- [1] Lu Z., Zheng X., Ding C., et al. // *Biomolecules*. **12** (9). (2022).
- [2] Chandra R.A., Keane F.K., Voncken F.E.M., Thomas C.R.Jr. // *Lancet*. **10**. (2021).
- [3] Newhauser W.D, Zhang R. // *Phys Med Biol*. **60**. (2015).
- [4] Atkinson J., Bezak E., Le H., Kempson I. // *Phys. Eng. Sci. Med*. **46**. 529 (2023).
- [5] Dai Y., Liang R., Wang J. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* **99**ю 1542 (2023).
- [6] Tashiro M., Yoshida Y., Oike T. et al. // *Anticancer Res*. **42**. 2469 (2022).
- [7] Diffenderfer E.S., Verginadis I.I., Kim M.M. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol.* **106**. 440 (2020).
- [8] Almeida A., Godfroid C., Leavitt R.J. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **118**. 1110 (2024).
- [9] Bourhis J., Sozzi W.J., Jorge P.G. et al. // *Radiother. Oncol.* **139**. 18 (2019).
- [10] Daugherty E.C., Mascia A.E., Sertorio M.G.B. et al. // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. **114**, N 3. S4 (2022).
- [11] Акулиничев С.В., Васильев В.Н., Гаврилов Ю.К. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. **84**. 11. 1325 (2020). (Akulinichev S.V., Vasiliev V.N., Gavrilov Y.K. et al. *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* **84**. 1325 (2020).
- [12] Eriksson D., Stigbrand T. // *Tumor Biol*. **31**, 363 (2010).
- [13] Новиков В.С., Шустов Е.Б. // *Вестник образования и развития науки Российской академии естественных наук*. **4**. 15 (2021).
- [14] Сербин М.Е., Щербак Е.В. // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии. **1**. 46 (2004).
- [15] Акулиничев С.В., Боженко В.К., Гаврилов Ю.К. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. **84**. 11. 1648 (2020). (Akulinichev S.V., Gavrilov Y.K., Kokontsev D.A. et al. // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. **84**, N 11. 1403 (2020).
- [16] Akulinichev S.V., Gavrilov Yu.K., Djilkibaev R.M. et al. // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. **87**. N 8. 1242 (2023).
- [17] Блинова Е.А., Котикова А.И., Янишевская М.А., Аклеев А.В. // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. **65**, N 4. 36 (2020).
- [18] Haimovitz-Friedman A., Yang Tzu-I J., Thin Tin Htwe, Verheij M. // *Radiation Research*. **177**, 4. 467 (2012).
- [19] Mead T.J., Lefebvre V. // *Methods Mol. Biol.* **1130**. 233 (2014).

- [20] *Salic A., Mitchison T.J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105.** 7. (2008).
- [21] *Menghua Li, Sen Zhou, Guofu Dong et al.* // *Oncol. Lett.* **6.** 602 (2024).
- [22] *Auer S., Hable V., Greubel C. et al.* // *Radiat. Oncol.* **6:**139 (2011).
- [23] *Beddok A., Fouillade C., Quelennec E., Favaudon V.* // *Radiotherapy and Oncology.* **123.** 9 (2017).
- [24] *Fouillade C., Curras-Alonso S., Giuranno L. et al.* // *Clin. Cancer. Res.* **26**(6). 1497 (2020).
- [25] *Favaudon V., Caplier L., Monceau V. et al.* // *Sci. Transl. Med.* **18,** **11.** 523 (2019).
- [26] *Shi X., Yang Y., Zhang W. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **119**(43). (2022).
- [27] *Montay-Gruel P., Acharya M.M., Petersson K. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**(41). 25946.
- [28] *Vozenin M.C., De Fornel P., Petersson K. et al.* // *Clin. Cancer. Res.* **25**(1). 35 (2019).
- [29] *Beyreuther E., Brand M., Hans S. et al.* // *Radiother Oncol.* **139.** 46 (2019).

Analysis of cell death and proliferative activity of cell cultures under proton irradiation in flash mode

V.V. Martynova^a, S.V. Akulinichev, I.A. Yakovlev

Institute for Nuclear Research, Russian Academy of Sciences. Moscow, 117312, Russia

E-mail: ^adonvaleriia@gmail.com

The study of biological effects of accelerated protons with ultra-high dose rate in and outside the Bragg peak on tumor and normal cell lines is necessary for understanding the consequences of this effect and choosing optimal doses and modes for further use in tumor radiotherapy. In this work, human colon adenocarcinoma cells (HT-29) and normal mesenchymal stem cells (ADSC) of human adipose tissue — fibroblasts were irradiated. Irradiation was carried out using a high-current linear proton accelerator of the INR RAS, which allows varying the energy in the range of 70–230 MeV. The dose was delivered in three different modes: conventional mode (dose rate $\dot{D} < 1$ Gy/s), flash mode ($\dot{D} \sim 100$ Gy/s) and single-pulse flash mode ($\dot{D} > 10^4$ Gy/s) in the modified Bragg peak region. To analyze cell death, staining with propidium iodide and annexin was performed. For proliferative potential, the EdU test was reproduced. After 24 h, an increase in the number of apoptotic HT-29 cells was detected in all modes, for fibroblasts, an increase in the number of necrotic cells was observed with the conventional irradiation mode and a higher dose compared to other modes. After 48 h, with all irradiation modes, a tendency towards a decrease in the number of necrotic HT-29 cells depending on the dose was observed with the flash/splash modes and a low level of such for fibroblasts. The number of DNA-synthesizing cells by 120 h significantly decreased with all doses and irradiation modes. The curves for the flash and splash irradiation modes were almost parallel. Further studies are needed using wider ranges of cell lines and doses.

PACS: 87.64.-t.

Keywords: flash therapy, proton therapy, cell death, proliferative potential.

Received 30 September 2024.

English version: *Moscow University Physics Bulletin.* 2025. **80**, No. . Pp. .

Сведения об авторах

1. Мартынова Валерия Владимировна — мл. науч. сотрудник; тел.: (495) 850-42-63, e-mail: donvaleriia@gmail.com.
2. Акулиничев Сергей Всеволодович — зав. лабораторией, доктор физ.-мат. наук; тел.: (495) 850-42-63, e-mail: akulnic@inr.ru.
3. Яковлев Иван Андреевич — науч. сотрудник, канд. физ.-мат. наук; тел.: (495).850-42-63, e-mail: iv.a.yakovlev@gmail.com.