

Отчет по теме 04-2-1132-2017/2019

«Проведение медико-биологических и радиационно-генетических исследований с использованием различных типов ионизирующих излучений» за 2017-2019 годы

Проект: «Совершенствование методов, технологий, режимов планирования и проведения лучевой терапии»

Основной целью проекта является проведение на базе Медико-технического комплекса (МТК) ЛЯП ОИЯИ медико-биологических и клинических исследований по изучению эффективности адронной терапии различных новообразований, совершенствование оборудования и аппаратуры и разработка новых методов лучевой терапии онкологических больных на медицинских адронных пучках фазотрона ОИЯИ. Также в рамках проекта осуществляются радиобиологические исследования, направленные на повышение эффективности проводимой радиотерапии и снижения степени ее токсичности.

В течение 2017-2019 годов в рамках проекта были получены следующие основные результаты.

Клинические исследования

Совместно с Российской медицинской академией непрерывного профессионального образования Минздрава РФ (г. Москва) и радиологическим отделением МСЧ-9 ФМБА проводились регулярные сеансы протонной терапии по клиническому исследованию ее эффективности при лечении различных новообразований. В течение последних 3-х лет проведен 21, так называемый, лечебный цикл суммарной продолжительностью более 80 недель. Ускоритель ЛЯП был задействован на эти исследования около 2700 часов.

На медицинском протонном пучке курс фракционированного лучевого лечения прошли около 150 пациентов, при этом общее количество протонных терапевтических облучений (полей) превысило 12000. Кроме того, на гамма-терапевтическом аппарате «Рокус-М» были пролечены еще около 75 пациентов.

Продолжалась систематизация накопленных клинических данных по многочисленным пролеченным в МТК нозологиям. За последние 3 года был проведен статистический анализ по протонной терапии хордом и хондросарком основания черепа. Это редкие злокачественные опухоли, составляющие менее 0,5 % от числа первичных внутричерепных новообразований. Хордомы развиваются из остатков эмбриональной хорды. Внутричерепные хондросаркомы – из эмбриональных остатков хрящевой матрицы черепа или из примитивных мезенхимальных клеток. В процессе роста эти опухоли разрушают кости основания черепа и, проникая интракраниально, вызывают поражение структур головного мозга, черепно-мозговых нервов и сосудов. При всей схожести локализации, клинических проявлений, рентгенологических данных и лечебной тактики – прогноз при хондросаркомах более благоприятный, чем при хордомиомах.

Основным методом лечения хордом и хондросарком основания черепа остается хирургический, но инфильтративный характер роста и близкое расположение к критическим структурам головного мозга затрудняют выполнение радикальных операций. Почти у 90 % пациентов после проведения операции сохраняется остаточный объем, а у ряда пациентов в силу различных причин хирургическое вмешательство не проводится. При отсутствии терапии, средняя продолжительность жизни пациентов с хордомами основания черепа составляет от 18 до 28 месяцев.

С 2002 по 2016 гг. протонная трехмерная конформная терапия была прове-

дена 28 больным с хордами и хондросаркомами основания черепа (рис. 1). Средний объем опухоли составил 42 см^3 ($3,9 \text{ см}^3$ - 154 см^3). Средняя суммарная очаговая доза на изоцентр была равна 73 Гр (63-80 Гр). Дозовые нагрузки на критические структуры не превышали толерантных значений. Средняя доза на поверхности ствола головного мозга составила 62 Гр (56,6-64 Гр). Хиазма зрительных нервов в среднем получала 46 Гр (9-56 Гр).

Период наблюдения за пациентами в среднем составил 59 месяцев (2-160 мес.). Из 28 пациентов у 18 человек сохраняется контроль опухоли. Семь больных по различным причинам выпали из наблюдения. У 3-х пациентов развился краевой рецидив.

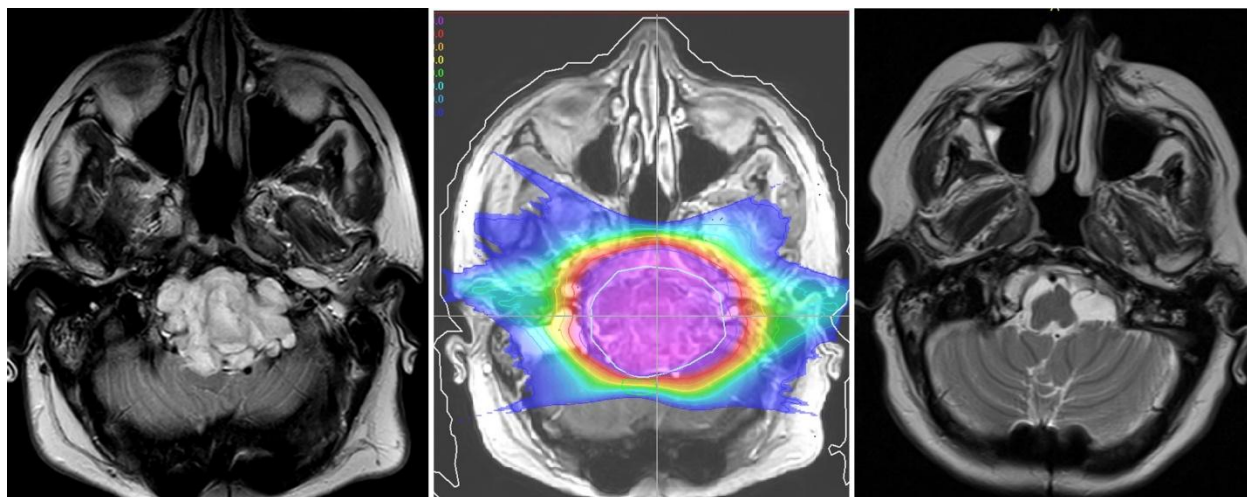


Рис. 1. Пример протонной мелкофракционированной терапии хордомы основания черепа: МРТ до лечения (слева), план облучения (в середине) и МРТ через 2 года после – значительная регрессия опухоли

Лучевые реакции и осложнения развились у 4-х человек (16,6 %). Имели место острые лучевые реакции, соответствовавшие 2-м баллам по шкале RTOG: со стороны слизистых оболочек рото- и носоглотки, конъюнктивы глаза и кожных покровов в области полей облучения. Ни со стороны ствола головного мозга, ни со стороны зрительного аппарата признаков лучевой токсичности и лучевых осложнений не отмечено.

По приведенному статистическому анализу можно сделать следующие выводы: протонная радиохirurgия и радиотерапия, проводимая на пучках фазотрона ОИЯИ, является высокоэффективной и безопасной методикой лечения хордом и хондросарком основания черепа, которые ввиду близкого расположения к критическим структурам головного мозга, являются наиболее сложными из всех внутричерепных мишеней. Полученные результаты сопоставимы с данными зарубежных центров протонной терапии.

Разработка и совершенствование оборудования и новых методик облучения

Были продолжены работы по разработанному и изготовленному макету автоматизированного многолепесткового коллиматора протонного пучка на 4 пары пластин. После завершения к концу 2019 г. его испытаний и отработки всех технологий макет послужит прообразом полномасштабного варианта устройства на 33 пары пластин, необходимого для реализации так называемого динамического метода облучения протонным пучком различных новообразований (рис. 2).

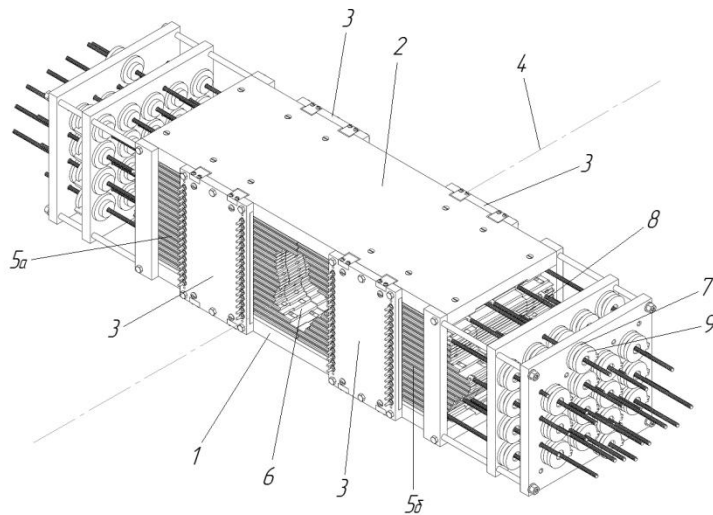


Рис. 2. Конструкция многолепесткового коллиматора на 33 пары пластин с индивидуальными приводами и датчиками положения

Устройство позволит решить задачу максимально быстро и точно сформировать любую заданную апертуру терапевтического протонного пучка и реализовать различные методики облучения с целью подведения максимальной поглощенной дозы к глубоко расположенной опухоли и при этом минимизировать облучение здоровых тканей, т.е. соблюсти предельную степень конформности облучения.

Кроме того, использование предлагаемого многолепесткового коллиматора позволит сократить время сеанса облучения, уменьшить дозовую нагрузку на персонал от облучения наведенной радиоактивностью от индивидуальных формирующих коллиматоров, снизить трудозатраты и стоимость по сравнению с применяемыми в настоящее время индивидуальными коллиматорами.

Продолжались разработка и тестирование компонентов трехмерной программы компьютерного моделирования конформной протонной лучевой терапии. До недавнего времени в МТК для планирования облучения использовалась программа, разработанная в центре протонной терапии в г. Лома-Линда, США, и адаптированная к пучкам фазотрона. Однако эта программа не может быть модифицирована для соответствия новым методикам облучения, например, динамическому облучению опухоли с использованием многолепесткового коллиматора. Разработанный вариант программы успешно прошел дозиметрическую верификацию с использованием гетерогенного фантома Алдерсона и радиоохромных пленок (рис. 3), и в настоящее время проводится его клиническая апробация.

Завершено создание программно-аппаратного комплекса на основе цифрового рентгеновского экрана для автоматического контроля пространственного положения пациентов относительно протонного пучка во время проведения облучения. Система позволит сократить время, необходимое для проведения сеанса терапии, и одновременно повысить точность наведения пучка на мишень. В настоящее время проводится ее апробация в сеансах протонной терапии.

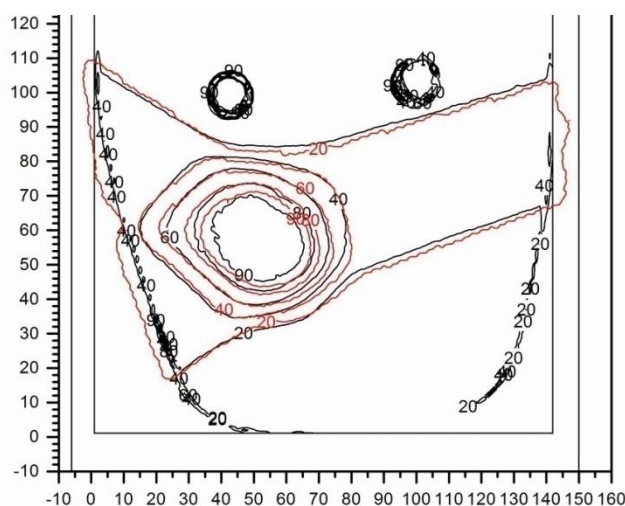


Рис. 3. Сравнение дозного распределения, рассчитанного разработанной программой планирования (красные изолинии), с измеренным с помощью радиохромной пленки распределением (черные изолинии). Наблюдается хорошее пространственное совпадение соответствующих изолиний.

Дозиметрия адронных пучков

Совместно с сотрудниками Отдела радиационной дозиметрии Института ядерной физики (Прага, Чехия) регулярно проводилась дозиметрическая калибровка источника Co-60 гамма-облучателя РОКУС-М на основе рекомендаций МАГАТЭ с использованием водяного фантома. Благодаря этому точность измерения и отпуска дозы при проведении протонной терапии находится на уровне 3 %, что соответствует мировым стандартам.

Совместно с сотрудниками Отдела радиационной дозиметрии Института ядерной физики (Прага, Чехия) были продолжены работы по измерению фоновых условий в кабине протонной терапии ЛЯП ОИЯИ с использованием термолюминесцентных детекторов и радиохромных пленок. Совместно с сотрудниками ЛРБ проводились работы по измерению нейтронного фона в кабине протонной терапии МТК. Эти измерения важны для оценки риска облучения здоровых тканей во время проведения протонной радиотерапии и, как следствие, возможности возникновения у пациентов индуцированного рака.

Совместно с сотрудниками Отдела радиационной дозиметрии Института ядерной физики (Прага, Чехия) проведены также измерения спектров ЛПЭ терапевтического протонного пучка фазотрона ЛЯП с использованием кремниевых детекторов Liulin и Medipix. На основе измеренных спектров ЛПЭ оценивалась относительная биологическая эффективность протонного пучка фазотрона, которая является фундаментальной величиной при применении ионизирующих излучений в радиотерапии и радиобиологии. Совместно с сотрудниками Института медико-биологических проблем и ЛРБ ОИЯИ проводились работы по изучению воздействия протонов с различными значениями ЛПЭ на биологические объекты.

Совместно с сотрудниками Факультета физики Бухарестского университета (Магурель, Румыния), Отдела радиационной дозиметрии Института ядерной физики (Прага, Чехия) и центра протонной терапии в Праге проводились измерения влияния зубных имплантов на пространственные дозные распределения в антропоморфном фантоме на протонных пучках фазотрона ЛЯП ОИЯИ и РТС в Праге. Кроме того, подобные эксперименты были проведены в Центре протонной терапии в г. Чикаго (США) с использованием разработанной в этом центре методики протонной компьютерной томо-

графии и программного обеспечения для планирования протонной терапии на основе метода Монте-Карло.

Было показано, что при наличии в непосредственной близости от облучаемого очага имплантов на основе сплавов титана форма дозного распределения далека от формы расчетного поля как в случае статического облучения широким однородным в сечении протонным пучком, так и в случае сканирующего облучения тонким «карандашным пучком». Однако, если для планирования облучения использовать не данные с рентгеновского компьютерного томографа, а данные, полученные на протонном томографе, ситуация становится существенно лучше.

По результатам этих исследований была защищена PhD диссертация.

Радиобиология

Проводилось клиническое испытание радиозащитного действия лазерного устройства с длиной волны 532 нм (по рекомендации врача и с согласия пациента) на кожу лица, шеи, носоглотки и гортаноглотки радиочувствительных пациентов, проходящих курс лучевой терапии в МТК. Лазерное излучение оказывало эффективное радиозащитное действие, как при предварительном, так и последующем лазерном облучении.

В настоящее время проводятся исследования форм инактивации клеток фибробластов мышей после воздействия ионизирующих излучений, а также комбинированно облученных ионизирующими излучениями и лазерным излучением.

Ранее нами было показано, что как предварительное и последующее, так и одновременное с лазерным излучением (с длиной волны 633 нм) облучение фибробластов мышей СЗН10Т1/2 приводит к увеличению выживаемости клеток, подвергшихся воздействию гамма-излучения или протонов. Для выяснения механизма радиозащитного действия лазерного излучения представляет большой интерес проверка предположения о том, что при радиозащитном воздействии лазерного излучения первичным фоторецептором является цитохром-с-оксидаза - компонент дыхательной цепи, локализованной в клеточных митохондриях. С этой целью нами было создано устройство на основе лазерного модуля с длиной волны 532 нм, поскольку эта длина волны также попадает в спектр поглощения цитохром-с-оксидазы.

Определение выживаемости клеток СЗН10Т1/2 с помощью автоматического счетчика СТ20 (Bio-Rad Laboratories, США) после воздействия ионизирующего и комбинированных облучений показали, что радиозащитное действие лазерного излучения с длиной волны 533 нм также, как и излучения с длиной волны 633 нм, передается по механизму “bystander” эффекта. Кроме этого, выяснилось, что радиозащитный эффект лазерного облучения наблюдается по критерию количества выживших одиночных клеток, по сравнению с клетками, подвергшимися облучению гамма-лучами.

Кривые выживания клеток фибробластов, облученных гамма-лучами, а также комбинированно облученных гамма-лучами и лазером ($0,56 \text{ мДж/см}^2$) показали, что лазерное облучение оказывает эффективное радиозащитное действие по критерию выросших клеточных колоний. При этом значение фактора изменения дозы (ФИД), рассчитанное по ЛД50, равно 1,4.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения о том, что при радиозащитном действии малых доз лазерного излучения с длинами волн 633 нм и 532 нм первичным фоторецептором является цитохром-с-оксидаза, присутствующая во внутренней мембране митохондрий всех эукариот.

Экспериментальные данные свидетельствуют о высокой радиочувствительности определённых отделов головного мозга к воздействию тяжёлых заряженных частиц высоких энергий. Однако к настоящему времени многие аспекты проявления нейробио-

зиологических эффектов воздействия ионизирующих излучений с различными физическими характеристиками остаются невыясненными.

В 2018–2019 гг. были выполнены работы по изучению нейрохимических показателей головного мозга и поведенческих реакций у крыс после воздействия ионов углерода, протонов, нейтронов и γ -квантов в дозе 1 Гр. Получена обобщённая карта структур мозга, в которых наблюдаются наиболее существенные изменения в метаболизме норадреналина, дофамина и серотонина после облучения. Показано, что нейрохимический ответ структур мозга на воздействие разных ионизирующих излучений различается и зависит от качества излучения. Обнаружены факты, свидетельствующие о гиперактивации компенсаторно-восстановительных механизмов, которые приводят к частичному восстановлению функций одних областей мозга и, вместе с тем, участвуют в формировании отдаленных эффектов облучения в других чувствительных к радиации областях. Получены данные о закономерностях нейрохимических изменений после воздействия излучения с низкими и умеренными значениями линейной передачи энергии. Показано, что увеличение ЛПЭ с относительно низких до умеренных значений приводит к различным нейрохимическим последствиям в зависимости от рассматриваемой структуры мозга. Предложена гипотеза о том, что гиперактивация нейрохимических механизмов при воздействии излучений с умеренной ЛПЭ сглаживает отклонения в метаболизме моноаминов на рассмотренных промежутках времени (30 и 90 суток) после облучения, но в последствии может приводить к отдаленным нарушениям функций мозга. Основываясь на полученных результатах, сделаны заключения о возможном вкладе наблюдаемых изменений в нарушение поведенческих функций у лабораторных животных.

Опубликованы новые статьи цикла работ по серии экспериментов по изучению обмена моноаминов и их метаболитов в головном мозге крыс после воздействия ионов углерода с энергией 500 МэВ/нуклон установки «Нуклотрон» и гамма-квантов ^{60}Co установки «РОКУС-М» в дозе 1 Гр.

В 2018–2019 годах реализуются совместные работы в рамках программы сотрудничества с ЮАР (iThemba LABS) по тематике «Нейрохимические исследования нейротрансмиттеров в тканях мозга после воздействия нейтронов, протонов и гамма-квантов». Работы по данной тематике ориентированы на исследование радиационных эффектов в центральной нервной системе — проблемы, которая является актуальной на протяжении последних десятилетий главным образом ввиду нарастающего применения ионизирующих излучений в терапии опухолей мозга и вопросов радиационной защиты космонавтов в длительных космических полетах за пределами магнитосферы Земли. Работы включает серию поведенческих и нейрохимических экспериментов с использованием лабораторных животных (крыс), облучаемых пучками протонов и нейтронов на установках iThemba LABS. Проект реализуется в тесном сотрудничестве с Южноафриканским советом по медицинским исследованиям (SARMC) и в конце 2018 года вступил в активную фазу.

За последние несколько десятилетий наблюдается значительный прогресс в лучевой терапии злокачественных опухолей головы и шеи. В то же время, высокие темпы современной жизни, незаинтересованность пациентов в пролонгированном (и экономически более затратном) лучевом лечении заставляют искать альтернативные пути решения проблемы, один из которых – гипофракционирование.

Проведенные нами исследования с использованием экстремального гипофракционирования (10 Гр один раз в неделю, по понедельникам, суммарная доза облучения 20 Гр) для облучения головы мышей показали, что выбранный нами вариант экстремального гипофракционирования может успешно заменить традиционное фракционирование, которое в основном применяется при проведении радиотерапии для лечения опухолей головного мозга. Использование данного вида фракционирования может приве-

сти к сокращению срока проведения радиотерапии, а также увеличить пропускную способность медицинских центров, проводящих радиотерапию.

Повышение эффективности лучевой терапии имеет важное значение в лечении онкологических заболеваний. Этот факт обуславливает необходимость совершенствования методов лучевой терапии с целью увеличения поглощённой дозы облучения в опухоли и снижения риска поражения здоровых тканей. Большой потенциал в этом направлении имеет адронная терапия. Протоны позволяют в 2-3 раза уменьшить лучевую нагрузку на окружающие опухоль нормальные ткани по сравнению с γ -лучами. Тяжелые ионы характеризуются высоким значением линейной передачей энергии, которое способствуют генерации значительных повреждений в клетках. Хотя современная конформная лучевая терапия и дает относительно хорошие результаты, одной из основных причин неудачного лечения является способность опухолевых клеток восстанавливать повреждения после облучения. Поэтому для увеличения терапевтического эффекта довольно часто применяются комбинированные технологии, как пример, лучевая терапия в комбинации с металлическими наночастицами.

Увеличение локального энерговыделения в опухоли достигается инкорпорированием в опухоль частиц с большим Z (^{53}I , ^{64}Gd , ^{78}Pt , ^{79}Au и др.). Поражение клеток опухоли формируется как за счет первичного, так и за счет вторичного короткопробежного излучения, возникающего в результате взаимодействия налетающих частиц с атомами тяжелых элементов, сконцентрированных в опухолевых клетках.

Такое индуцированное излучение можно использоваться для повышения целевой дозы в ходе лучевой терапии злокачественных опухолей без увеличения нецелевой дозы, выделяемой в здоровых тканях.

Вторичные частицы, генерируемые при столкновении протонов с наночастицами, можно визуализировать и определить, например, при помощи детектора Timerix-3. Развитие этого нового направления в проекте начато совместно с коллегами сразу из нескольких центров России, Румынии и Чехии.

Публикации 2017-2019 гг.

1. Восканян К.Ш., Гаевский В.Н., Мицын Г.В., Рзянина А.В. Снижение радиационного поражения биологических объектов лазерным излучением // Известия Российской Военно-медицинской академии. Материалы “Первой всероссийской научной конференции токсикология и радиобиология XXI века”, 17-19 мая, Санкт-Петербург, 2017, Т.36, №2, С.236.

2. Иванов А.А., Мицын Г.В., Абросимова А.Н., Булынина Т.М., Гаевский В.Н., Дорожкина О.В., Ляхова К.Н., Северюхин Ю.С., Утина Д.М., Красавин Е.А. Радиобиологические эффекты вторичного излучения фазотрона Объединенного института ядерных исследований //Авиакосмическая и экологическая медицина, Изд: ГНЦ РФ ИМБП Москва. Т.51, №3, 2017, С.46-53.

3. Молоканов А.Г. Тяжелые заряженные частицы в лучевой терапии // Радиобиологические основы лучевой терапии: материалы международной конференции. Обнинск, 2017, С.92.

4. Molokanov A.G. Heavy charged particles in radiation therapy // XII International Scientific Workshop in Memory of Professor V.P. Sarantsev: Problems of Colliders and Charged Particle Accelerators. Alushta, Crimea, Russia, 2017.
5. Oancea C., Pachnerová K., Ambrožová I., Mytsin G., Greilich S., Davidková M. LET spectra behind high density dental and hip implants irradiated with a scanned carbon ion pencil beam // The 56th Annual Conference of the Particle Therapy Co-Operative Group PTCOG. Chiba, Yokohama, Japan, 8-13 May, 2017.
6. Shipulin K., Oancea C., Borowicz D., Mytsin G., Vilimovsky J., Vondracek V. Verification of the “XiO” TPS using radiochromic films // The 56th Annual Conference of the Particle Therapy Co-Operative Group PTCOG. Chiba, Yokohama, Japan, 8-13 May, 2017.
7. Tseitlina M.A., Agapov A.V., Gaevsky V.N., Kizhaev G., I.A., Luchin Ye.I., Molokanov A.G., Mytsin G.V., Shipulin K.N., Shvidky S.V. Proton beam therapy for chordomas and chondrosarcomas of skull base // The 56th Annual Conference of the Particle Therapy Co-Operative Group PTCOG. Poster session. Chiba, Yokohama, Japan, 8-13 May, 2017.
8. Oancea C., Shipulin K., Mytsin G., Molokanov A., Vondráček V., Ambrožová I., Davidková M. Dose Distributions Delivered by Double Scattering and Pencil Scanning Beam Systems to Head Phantom Containing Dental Implants // Neutron and Ion Dosimetry Symposium NEUDOS-13, Krakow, Poland, 14-19 May 2017.
9. Oancea C. The Influence of Metallic Implants on the Accuracy of IMPT Plans Proton Cancer Therapy // 3rd Annual Loma Linda Imaging and IMRT/IMPT algorithm workshop. Loma Linda, California, USA, 4-10 August 2017.
10. Агапов А.В., Мицын Г.В. Многоканальная система измерения магнитных полей элементов канала транспортировки протонного пучка на основе датчиков Холла. Сообщение ОИЯИ, P13-2017-16, Дубна, 2017.
11. Агапов А.В., Гаевский В.Н., Лучин Е.И., Мицын Г.В., Молоканов А.Г., Цейтлина М.А., Швидкий С.В., Шипулин К.Н. 50 лет со дня облучения первого пациента протонным пучком в Объединенном институте ядерных исследований (Дубна) // Медицинская физика. № 4 (76), Москва, 2017, С.121-125.
12. Белокопытова К.В., Белов О.В., Гаевский В.Н., Наркевич В.Б., Кудрин В.С., Красавин Е.А., Базян А.С. Динамика нейромедиаторного обмена у крыс в поздние сроки после облучения γ -квантами ^{60}Co // Медицинская радиология и радиационная безопасность. Т.62, №2, 2017, С.5-12.
13. Oancea C., Shipulin K., Mytsin G., Molokanov A., Nicolae D., Ambrožová I., Davidková M. Effect of titanium dental implants on proton therapy delivered for head tumors: experimental validation using an anthropomorphic head phantom // Journal of Instrumentation, V.12, C03082. 2017.
14. Восканян К.Ш., Гаевский В.Н., Мицын Г.В., Рзянина А.В. Радиозащитное дей-

ствие лазерного излучения с длиной волны 532 нм на клетки фибробластов // Проблемы химической защиты и репарации при радиационных воздействиях: тезисы международной конференции. Дубна, ОИЯИ, 30-31 мая 2018, С.30-32.

15. Voskanyan K., Rzyanina A., Mitsyn G., Gaevskiy V. Radioprotective Effect of Laser Radiation With a Wavelength of 532 nm on Fibroblast Cells // Journal of Physical Science and Application. V.8, N.2, 2018, P.17-21.

16. Belov O.V., Belokopytova K.V., Kudrin V.S., Molokanov A.G., Shtemberg A.S., Bazyan A.S. Comparative insights into neurochemical outcomes of exposure to protons and carbon ions // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects, 2018.

17. Колесникова И.А., Буденная Н.Н., Северюхин Ю.С., Молоканов А.Г., Иванов А.А. Влияние нейропептида «СЕМАКС» на морфологические измерения нейронов головного мозга мышей при облучении протонами // Авиакосмическая и экологическая медицина. Т.52, №4, 2018.

18. Ploc O., Sommer M., Kákona M., Kubančák J., Peksová D., Sihver L., Molokanov A. Intercomparison of LET spectra measured with Timepix and TEPC in reference radiation field // CERF IEEE Aerospace Conference Proceedings. Big Sky, US, 2018.

19. Мокров Ю.В., Молоканов А.Г., Морозова С.В., Тимошенко Г.Н., Крылов В.А. Коррекция показаний альбедного дозиметра нейтронов ДВГН-01 в кабине медицинского пучка различными методами. Сообщение ОИЯИ Р16-2018-36, Дубна, 2018.

20. Oancea C., Ambrožová I., Popescu A.I., Mytsin G., Vondráček V., Davidková M. LET spectra behind high-density titanium and stainless steel hip implants irradiated with a therapeutic proton beam // Radiation Measurements 110. 2018, P.7-13.

21. Oancea C., Luu A., Ambrožová I., Mytsin G., Vondráček V., Davidková M. Perturbations of radiation field caused by titanium dental implants in pencil proton beam therapy // Physics in Medicine & Biology. V.63, N.21, 2018.

22. Агапов А.В., Гаевский В.Н., Кижаяев Е.В., Курганский Я.В., Лучин Е.И., Мицын Г.В., Молоканов А.Г., Цейтлина М.А., Швидкий С.В., Шипулин К.Н. Опыт использования протонной лучевой терапии в Объединенном институте ядерных исследований г. Дубна // Медицинская радиология и радиационная безопасность, Москва, 2019. Том 64, № 2, С.61-69.

23. Белов О.В., Белокопытова К.В., Базян А.С. О механизмах формирования радиационно-индуцированных нарушений энграммы памяти // «Нейронаука для медицины и психологии»: XV Международный Междисциплинарный Конгресс Труды Конгресса / Под ред. Лосевой Е.В., Крючковой А.В., Логиновой Н.А. Судак, Крым, Россия. 2019, С.87-88.

24. Белокопытова К.В., Белов О.В., Базян А.С. Иерархические сети мозга и их роль в формировании радиационно-индуцированных нарушений когнитивных процессов //

«Нейронаука для медицины и психологии»: XV Международный Междисциплинарный Конгресс Труды Конгресса / Под ред. Лосевой Е.В., Крючковой А.В., Логиновой Н.А. Судак, Крым, Россия. 2019, С.88-89.

25. Belov O.V., Belokopytova K.V., Kudrin V.S., Molokanov A.G., Shtemberg A.S., Bazyan A.S. Neurochemical insights into the radiation protection of astronauts: distinction between low- and moderate- LET radiation components // European Journal of Medical Physics (Physica Medica). 2019, V. 57, P.7-16.

26. Белокопытова К.В., Белов О.В., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Базян А.С. Избирательная чувствительность отделов головного мозга при радиационном воздействии // «Нейронаука для медицины и психологии»: XV Международный Междисциплинарный Конгресс Труды Конгресса / Под ред. Лосевой Е.В., Крючковой А.В., Логиновой Н.А. Судак, Крым, Россия. 2019, С.100.

27. Белокопытова К.В., Белов О.В., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Красавин Е.А., Тимошенко Г.Н., Базян А.С. Исследование нейрохимических показателей у крыс после воздействия ионов углерода и гамма-квантов // «Нейронаука для медицины и психологии»: XV Международный Междисциплинарный Конгресс Труды Конгресса / Под ред. Лосевой Е.В., Крючковой А.В., Логиновой Н.А. Судак, Крым, Россия. 2019, С.91.

28. Borowicz D., Malicki J., Mytsin G., Shipulin K. Dose distribution at the Bragg peak: Dose measurements using EBT and RTQA gafchromic film set at two positions to the central beam axis // Medical Physics, V.44, N.4, 2017, P.1538-1544.

29. Ляхова К.Н., Колесникова И.А., Буденная Н.Н., Северюхин Ю.С., Бычкова М., Никитенко О.В., Утина Д.М., Молоканов А.Г., Иванов А.А. Влияние препарата “СЕМАКС” на жизненный статус и морфологические изменения в головном мозге мышей при облучении протонами // Радиационная биология. Радиозэкология. Т.59, №2, 2019, С.191-199.

30. Ляхова К.Н., Колесникова И.А., Утина Д.М., Северюхин Ю.С., Буденная Н.Н., Абросимова А.Н., Молоканов А.Г., Лалковичова М., Иванов А.А. Морфофункциональные показатели воздействия протонов на центральную нервную систему // Медицинская радиология и радиационная безопасность. Т64, №2, 2019, С.75-81.

31. Шипулин К.Н.. Автоматическая верификация положения пациента при проведении конформной лучевой терапии // Медицинская физика. 2019 (в печати).

Проект Радиоген
«Экспериментальное обоснование оценки генетического риска
ионизирующей радиации по частоте наследуемых изменений
ДНК структурных генов животных и человека»

Целью проекта являлось экспериментальное обоснование современного молекулярного подхода к оценке генетической опасности (риска) ионизирующей радиации при её действии на генеративные клетки животных организмов. В основе этого подхода должен лежать анализ характера и частоты наследуемых изменений ДНК гена, выявляемых современными методами молекулярной генетики и биологии (полимеразная цепная реакция - ПЦР и секвенирование).

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- Методом ПЦР изучить природу наследуемых изменений ДНК γ - и нейтрон-индуцированных «точковых» мутаций пяти изучаемых генов и оценить характер зависимости этих изменений от дозы радиации;
- Методом секвенирования изучить характер, частоту и распределение на карте гена изменений ДНК, выявляемых этим методом;
- Определить частоту индукции наследуемых микро-изменений ДНК гена в расчете на 1Гр на 1 нуклеотид.
- На основании полученных данных о частоте индукции наследуемых изменений ДНК и данных литературы о спонтанной частоте таких изменений определить значение удваивающей дозы редко-ионизирующего излучения как максимально допустимой при оценке генетической опасности радиации для популяций животных и человека.

Экспериментальным материалом для достижения поставленной цели являлись γ - и нейтрон-индуцированные мутации пяти генов *Drosophila melanogaster* разной величины, внутренней экзон-интронной организации и локализации в геноме (на политенных хромосомах) (рис. 1).

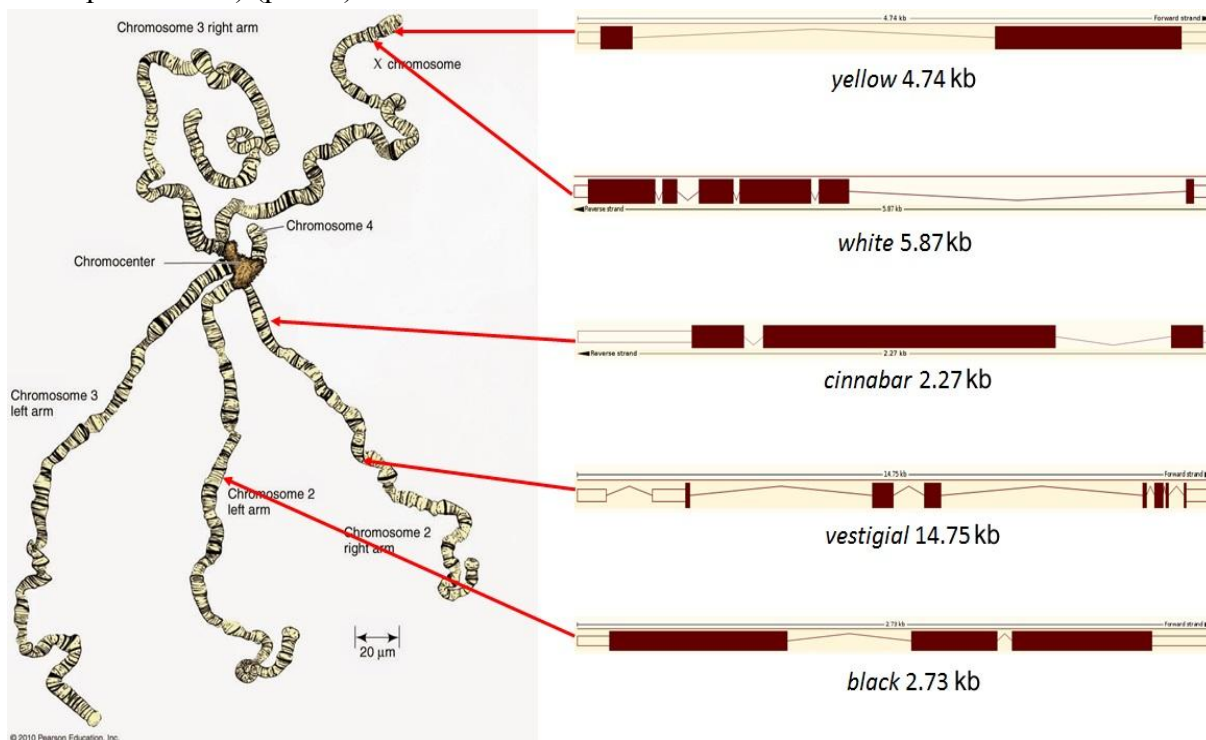


Fig. 1. The size, molecular organization and location on the polytene chromosomes of the five *Drosophila melanogaster* genes radiation-induced mutations of which were studied.

Спонтанные и радиационно-индуцированные мутации названных генов были получены путем скрещивания интактных или облученных самцов дикой лабораторной линии Д-32 с самками тестер-линии KL, имеющими генотип $In(1)sc^8 +dl-49, y^{31d} sc^8 w^a ;b^1 cn^1 vg^1$. Среди регулярного потомства первого поколения отбирались мутанты с фенотипом того или иного из названных генов. Последующий генетический и цитогенетический анализ каждой мутантной особи позволил установить сложный спектр генетических изменений, лежащих в основе изучаемых мутаций. Тем не менее в нем можно выделить два главных класса мутаций: в основе первого из них лежат наследуемые рецессивные летали в виде структурных изменений генома, так или иначе затрагивающих изучаемый ген, тогда как второй класс представлен рецессивными, наследуемыми по менделевскому типу, изменениями внутри гена (так наз. «точковые» мутации) (рис. 2).

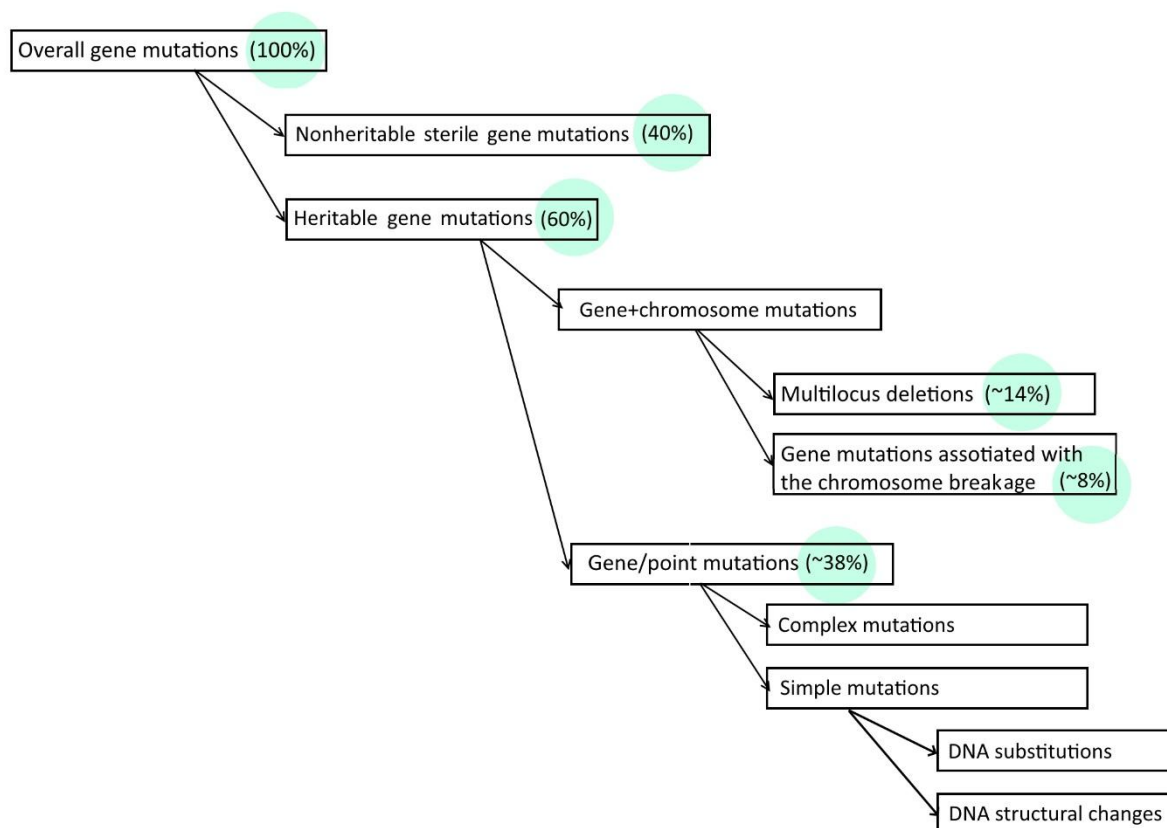


Fig. 2. Spectrum of γ -ray- or neutron-induced locus-specific mutations in the sperm cells of *Drosophila melanogaster* recovered by the genetic, cytogenetic and PCR-analysis.

Именно рецессивные «точковые» мутации лежат в основе почти половины наследственных генетических болезней человека, молекулярная природа которых в настоящее время систематически изучается. В этой связи изучение молекулярной природы спонтанных и радиационно-индуцированных «точковых» мутаций стало основным направлением экспериментальных исследований в рамках данного проекта.

Первым этапом этих исследований стало изучение изменений структуры ДНК у мутаций пяти изучаемых генов методом ПЦР. Согласно полученным результатам, основанным на 2500 реакций ПЦР для всех пяти генов, общая картина регистрируемых изменений близко совпадает и включает две основные категории мутаций, в основе которых лежат микроизменения ДНК не идентифицируемые этим методом (ПЦР⁺-мутанты), и мутации в виде делеций ДНК разной величины и локализации на карте гена (ПЦР⁻-мутаты) (Рис. 3).

№	Mutations	Origin	The <i>vestigial</i> gene fragment studied																
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
44	vg88b59	n, 2.5 Gy	+	*	+	■	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	vg88c3	»	■	**	+	+	+	+	+	+	■	+	+	+	+	+	+	+	+
46	vg88c64	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	■	+	+	+	+	+	+	+
47	vg88c87b	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	■	+	+	+	+	+	+
48	vg88c96	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	vg88b10	n, 5 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	■	+	+	+	+	+	+
50	vg88b32	»	■	+	■	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
51	vg88c30	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
52	vg79d6	n, 10 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
53	vg88c45	»	+	+	■	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
54	vg88c62	»	+	+	■	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55	vg88c102	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56	vg80l2	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
57	vg83l1	»	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
58	vg83d	cf, 7 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
59	vg82c13	cf 14 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	vg88f21	n + γ, 15 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
61	vg88g40	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62	vg79d5	n + γ, 20 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
63	vg88f66	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
64	vg88g108	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65	vg88h11	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
66	vg88f33	n + γ, 30 Gy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67	vg88g38	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
68	vg88e94	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fig. 3. As example, the size and location of intragenic deletions induced by different doses of neutrons at the *vestigial* gene of *Drosophila melanogaster* recovered by the PCR technique. *-a normal fragment, **- lack of fragment

Анализ соотношения двух категорий γ-индуцированных мутаций для отдельных генов показал, что ПЦР⁺-мутанты в 2-3 раза возникают чаще, чем ПЦР⁻ (p<0.001). Эта картина сохраняется в диапазоне доз 10-40Гр (Рис.4).

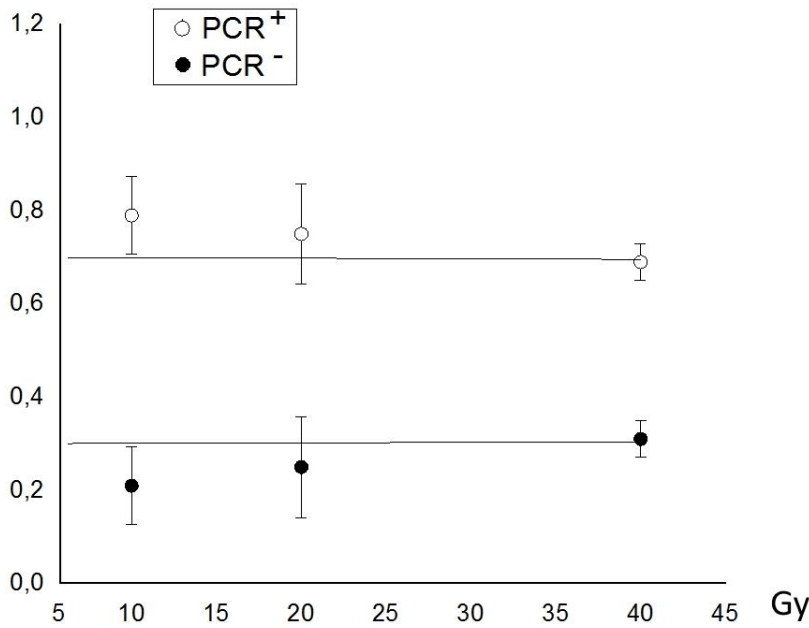


Fig. 4. The dose-effect dependence of PCR⁺ and PCR⁻ -mutants for five *Drosophila melanogaster* genes studied after action of ⁶⁰Co γ - irradiation.

Однако, при действии нейтронов картина относительной частоты тех и других ПЦР-мутантов отличается от таковой для γ -излучения, а именно, относительная частота ПЦР⁺-мутантов с ростом дозы растёт, а ПЦР⁻-мутантов - снижается. Причем, суммарно по всем дозам нейтроны в 2 раза эффективнее в индукции ПЦР⁺- мутантов по сравнению с ПЦР⁻-мутантами (Рис 5).

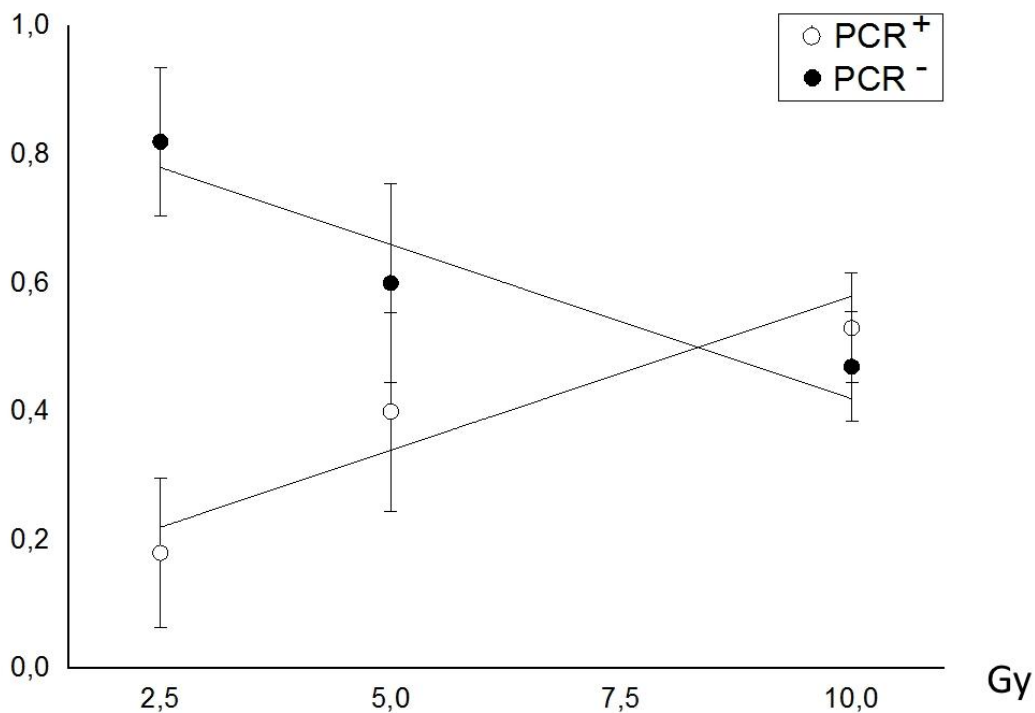


Fig. 5. The dose-effect dependence of PCR⁺ and PCR⁻ mutants for five *Drosophila melanogaster* genes studied after action of fission neutrons.

Это показывает, что в основе ПЦР⁺ мутаций могут лежать структурные изменения гена, в индукции которых нейтроны более эффективны, чем γ -излучение, для выяснения природы которых требуется проведение самостоятельных исследований. В контексте настоящего проекта детально была изучена методом секвенирования молекулярная природа ПЦР⁺ мутаций.

Анализ результатов завершённых работ по секвенированию спонтанных и индуцированных ПЦР⁺-мутантов сцепленного с полом гена *yellow* (изучено всего 30 мутантов) и аутосомного гена *black* (изучено всего 34 мутанта) показал, что в их основе могут лежать разные изменения ДНК, среди которых общими для двух генов являются замены отдельных оснований ДНК, микроделеции (1-53 пн), микроинсерции (1-15 пн), делеции + инсерции и крупные инсерции (> 5 тыс. пн) (Рис. 6,7). Специфичными для гена *black* оказались изменения в виде замен 2-3-х смежных оснований ДНК (6 случаев среди 45 выявленных изменений или 13,3%), а также геной конверсии (6 случаев из 465 или 13,3%) (Рис. 7).

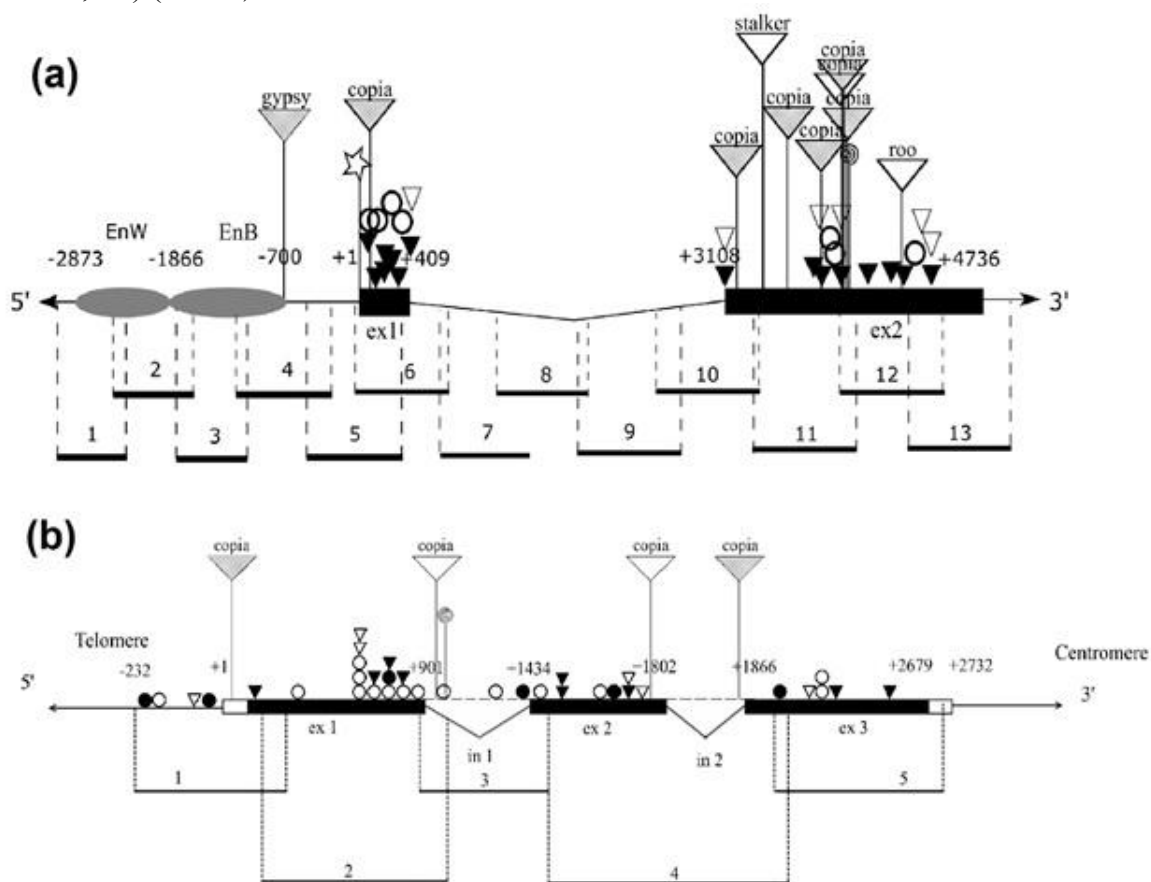


Fig. 6. Distribution of γ -ray-induced DNA changes on the linear map of the *yellow* (a) and *black* (b) genes of *Drosophila melanogaster*. ○ - base substitution, ● - substitution of > 2 bases, ▼ - micro-deletion, ▽ - micro-insertion, ⊙, ⊗ - spontaneous insertion of a large retrotransposons or other genomic DNA, ▽_{copia} - the same insertions in radiation-induced mutants.

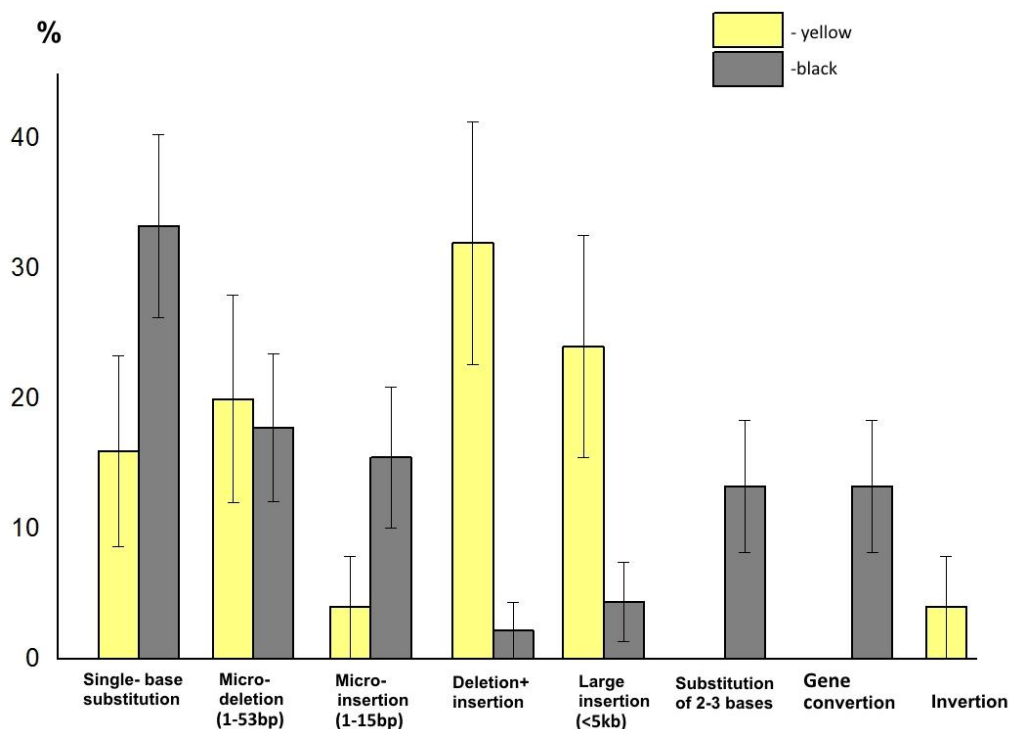


Fig.7. Spectra of γ -ray-induced DNA changes at the *yellow* and *black* genes of *Drosophila melanogaster*

Неожиданно высокой оказалась частота геной конверсии среди нейтрон-индуцированных ПЦР⁺-мутантов гена *black* (18 случаев среди 24 выявленных изменений ДНК или 75%). В основе остальных нейтрон-индуцированных ПЦР⁺-мутантов, как и в случае γ -излучения лежали крупная инсерция ретротранспозона (1 случай), микроделеция (1 случай), делеция+инсерция (1 случай), замены оснований (2 случая) и крупная делеция (1 случай) (Рис. 8). Обнаружение геной конверсии, т.е. замещение облученного отцовского гена *black*⁺³² интактным материнским *black*¹ стало возможным после секвенирования аллеля *black*¹ и установления тех изменений его ДНК, по которым он

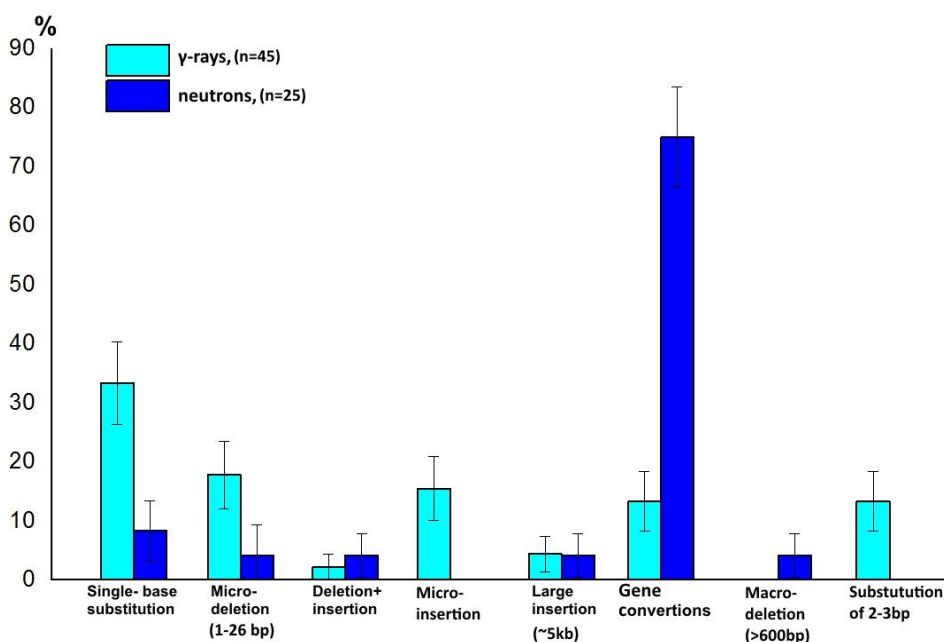


Fig.8. The relative frequency of different DNA changes induced by γ -rays and neutrons at the black gene of in *Drosophila melanogaster*

отличался от дикого аллеля *black*⁺³² (всего 26 полиморфных сайтов) на всем протяжении гена. Полное, а в ряде случаев частичное, замещение одного аллеля другим свидетельствует о репарации по механизму межallelльной гомологичной рекомбинации, которая впервые нами установлена на стадии ранней зиготы в период первого объединения гаплоидных геномов самки и самца. Тот факт, что после действия нейтронов частота генной конверсии почти в 6 раз выше, чем после γ -излучения (Рис. 8), показывает, что нейтрон-индуцированные первичные повреждения ДНК (локальные кластеры одно-и двунитевых разрывов) в геноме облученного спермия репарируются уже в ранней зиготе, главным образом, по механизму генной конверсии.

Анализ распределения на карте генов *yellow* и *black* γ -индуцированных микроизменений ДНК разного типа, выявленных секвенированием (Рис. 7) позволил предположить о неслучайном их положении с тенденцией к кластеризации в определенных районах гена. Проверка 0-гипотезы о случайном характере распределения таких изменений с помощью критерия χ^2 показала, что она справедлива для гена *yellow*, но не для *black*, для которого достоверно наблюдается ($p < 0,001$) кластеризация микроизменений ДНК в 3'-конце экзона 1 гена (Рис. 9).

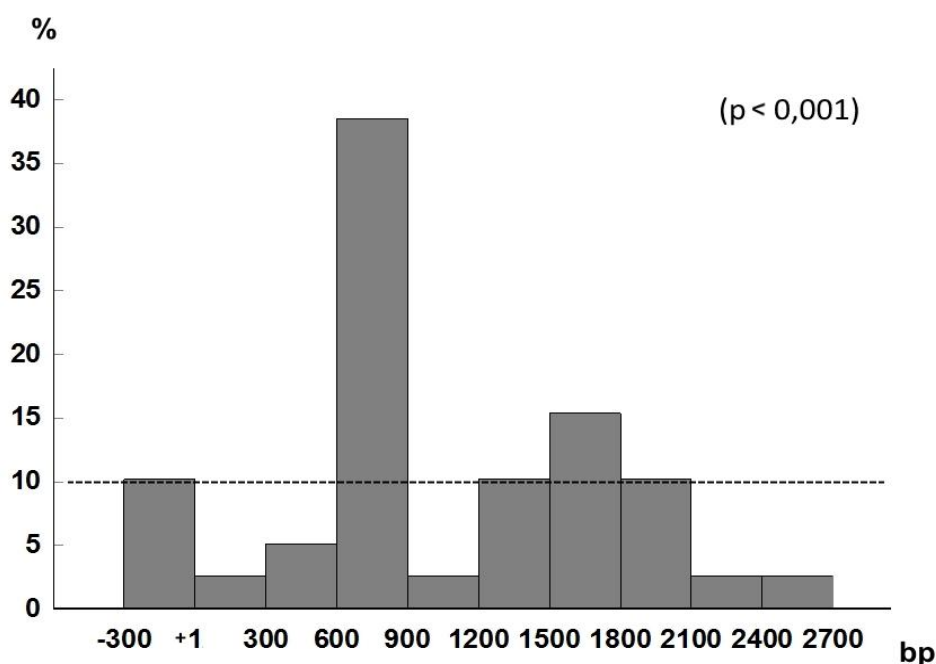


Fig. 9. Distribution of γ -ray-induced DNA micro-changes on the *black* gene map underlying the point mutations in *Drosophila melanogaster*

Полученные для гена *black* результаты секвенирования γ -индуцированных изменений в дозе 40Гр, как наиболее полные, позволяют впервые определить частоту замен оснований в расчете на 1 Гр и 1 нуклеотид, которая оказалась равной $2,1 \times 10^{-9}$ / Гр/нуклеотид. Знание спонтанной частоты таких замен в геноме *Drosophila melanogaster* ($3,5 \times 10^{-9}$ /нуклеотид/поколение), установленной другими авторами (P.D. Keightley et al, 2017), и полученное нами значение частоты γ -индуцированных замен оснований в геноме этого же организма позволяют получить первую оценку величины удваивающей дозы редко-ионизирующего излучения на молекулярном уровне, которая оказывается равной $3,5 \times 10^{-9}$ /нуклеотид/ $2,1 \times 10^{-9}$ /Гр/нуклеотид= 1,7 Гр. Эта сугубо предварительная оценка удваивающей дозы как критерия генетической опасности (риска) ионизирующей

радиации будет уточняться после завершения в текущем году работ по секвенированию трех других изучаемых генов. Эти работы в настоящее время успешно продолжаются.

По результатам проведенных исследований в рамках текущего проекта опубликовано 4 статьи в отечественном профильном рецензируемом журнале «Радиационная биология. Радиоэкология», а также сделаны устные доклады на нескольких конференциях и рабочих совещаниях.

Руководитель темы 04-2-1132

Г.В. Мицын