

*Е.Е. Бекетов<sup>1</sup>, Е.В. Исаева<sup>1</sup>, А.Н. Соловьев<sup>1</sup>, О.Ю. Голованова<sup>1</sup>, Л.Н. Ульяненко<sup>1</sup>,  
Е.П. Малахов<sup>1</sup>, А.А. Кисель<sup>1</sup>, С.Е. Ульяненко<sup>1</sup>, П.В. Шегай<sup>2</sup>, С.А. Иванов<sup>1</sup>,  
А.Д. Каприн<sup>2</sup>*

## **Равномерность биологической дозы в распределенном пике Брэгга терапевтической установки со сканирующим пучком протонов**

<sup>1</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск,

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

**Введение:** Проблема неопределенности в оценке ОБЭ протонов и в связи с этим равномерности биологической дозы в распределенном пике Брэгга современных установок для проведения протонной терапии приобретает все большее значение. Результаты ряда исследований указывают на повышение биологической эффективности протонов в дистальной части распределенного пика Брэгга. Целью настоящего исследования была проверка наличия подобного эффекта при использовании установки «Прометеус», обеспечивающей проведение терапии сканирующим карандашным пучком протонов.

**Материал и методы.** Исследование выполнено в МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. В качестве объекта исследования использованы клетки меланомы V16F10. Биологическое действие протонов оценивали по клоногенной активности клеток и повреждению ДНК методом ДНК-комет. Диапазон доз облучения составил 4÷8 Гр. Воздействию протонов подвергались клетки в состоянии суспензии и монослоя. Оценка биологической эффективности для каждой дозы проводили в трех положениях распределенного пика Брэгга.

Результаты, полученные *in vitro*, указывают на то, что система планирования установки «Прометеус» при однопольном облучении обеспечивает равномерность биологической дозы в трех положениях распределенного пика Брэгга. Наблюдается тенденция к большей эффективности протонов в проксимальной области распределенного пика Брэгга. Данные по повреждению ДНК подтверждают этот вывод.

**Заключение.** В отличие от ряда действующих установок для проведения протонной

терапии в случае терапевтического комплекса «Прометеус» повышения биологической эффективности в дистальной части распределенного пика Брэгга не наблюдается.

**Ключевые слова:** протонная терапия; сканирующий пучок; распределенный пик Брэгга; ОБЭ; ЛПЭ; меланома V16

### **Введение**

Активное внедрение протонов в схемы лучевой терапии злокачественных новообразований датируется началом 90-х годов прошлого века. По состоянию на август 2018 года (Particle Therapy Co-Operative Group) в мире действует 75 клинических центров адронной терапии. Несмотря на многолетние исследования, неопределенность в оценке относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов по-прежнему очень высока [1-3]. Это является основной причиной неопределенности в расчете биологической дозы при планировании протонной терапии. Международной комиссией по радиационным единицам и измерениям для терапии протонами рекомендовано использовать значение ОБЭ 1,1 во всем спектре распределенного пика Брэгга. Однако для большинства действующих в настоящее время установок фактическое значение ОБЭ протонного излучения отличается от рекомендованного в большую сторону и увеличивается с глубиной прохождения пучка в распределенном пике Брэгга из-за возрастания линейной передачи энергии (ЛПЭ), достигая максимума в его дистальной части [4-6]. Целью настоящего исследования была оценка равномерности биологической дозы в распределенном пике Брэгга установки «Прометеус» по данным клоногенной активности и повреждения ДНК опухолевых клеток линии V16F10.

## Материал и методы

Исследование проведено в МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России в 2017-18 гг.

### Биологическая тест система

Экспериментальные исследования были выполнены на культуре клеток мышинной меланомы B16F10 (далее – B16), полученной из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Культивирование клеток и оценку клоногенной активности проводили по ранее опубликованной методике [7]. Для определения степени повреждения ДНК использовали щелочную версию метода ДНК-комет [8]. Визуализация комет проводилась на флуоресцентном микроскопе Биомед 3 (Биомед, Россия) с камерой TourCam 3.1 (TourTek, Китай). Обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения Casp 1.2.2 (Krzysztof Kopca, GPLv2 license). Для каждой группы подсчитывали не менее 300 комет. В качестве основного показателя использовали «момент хвоста кометы».

### Сканирующий пучок протонов и схемы облучения

В качестве источника протонного излучения была использована терапевтическая установка «Прометеус» с горизонтальным сканирующим карандашным пучком (ЗАО «ПРОТОМ», г. Протвино). Верификация положения флаконов при облучении производилась с помощью лазерной системы позиционирования. В зависимости от энергии протонов диаметр сканирующего пучка варьировался от 9,4 мм при 30 МэВ до 2,4 мм при 250 МэВ. Облучение проводили с одного направления. Для формирования объемного поля облучения использовали клиническую систему планирования, входящую в комплект протонного терапевтического комплекса. В экспериментах в равномерном фантоме заданной плотности (1,03 г/см<sup>3</sup> в случае твердой воды CIRS PlasticWater, 1,00 г/см<sup>3</sup> для обычного водного фантома) был выделен контур, соответствующий планируемому опухолевому объему (RTV) в форме куба. Для оценки величин ЛПЭ в облучаемых объектах использовалась собственная методика [9], основанная на использовании среды Монте-Карло моделирования Geant4.

### Облучение клеток

В первой серии экспериментов проводили облучение клеток в состоянии монослоя в культуральных флаконах площадью 25 см<sup>2</sup>. На предметном столе (рис. 1), по ходу пучка располагали фантом типа «твердая вода» (CIRS, США), за ним находились три культуральных флакона в вертикальном положении. Флаконы были установлены таким образом, чтобы поверхность с монослоем клеток первого флакона вплотную прилегала к фантому. Расчетные величины ЛПЭ составили: 1,2±0,6, 2,8±1,7 и 7,4±1,8 кэВ/мкм в проксимальном (ближайшем к источнику), среднем и дистальном положениях распределенного пика Брэгга соответственно.

В данной серии экспериментов объем области RTV составлял 280,2 см<sup>3</sup> при допуске относительно флаконов во всех направлениях 5 мм. Дозы облучения составили 4, 6 и 8 Гр при мощности дозы ~0,6 Гр/мин. Облучение проводили при отключенной функции блока управления «оптимизация времени облучения», что обеспечивало максимальный спектр энергий протонов, формирующих распределенный пик Брэгга.

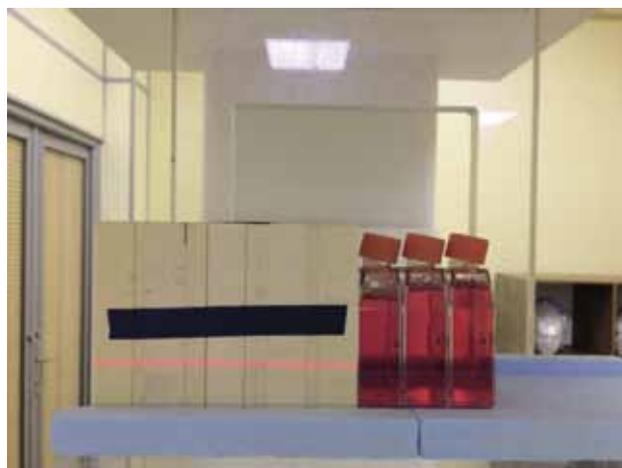


Рис. 1. Расположение культуральных флаконов во время облучения клеток в состоянии монослоя с применением фантома типа «твердая вода». Источник протонов – слева

Во второй серии экспериментов проводили облучение клеток в состоянии суспензии в микроцентрифужных пробирках типа Эппендорф. Для замедления протонов использовали водный фантом, непосредственно в котором располагали пробирки. Расстояния от края фантома до центра каждой пробирки: 5,5, 7,5 и 9,3 см. Перед облучением пробирки центрифугировали для локализации клеток. Расчетные величины ЛПЭ составили: 4,3±0,1, 5,5±0,3 и 6,4±1,2 кэВ/мкм в проксимальном (ближайшем к источнику), среднем и дистальном положениях распределенного пика Брэгга соответственно. Объем области RTV составлял 100,9 см<sup>3</sup> при допуске относительно пробирок во всех направлениях 5 мм. Дозы облучения составили 4, 6 и 8 Гр при мощности дозы ~1,2 Гр/мин. Облучение проводили в обычном режиме (с включенной функцией «оптимизация времени облучения»), что обеспечивало приближенность условий эксперимента к клиническому использованию установки.

В качестве источника стандартного излучения использовали гамма-установку «Луч» (Co<sup>60</sup>, E<sub>ср</sub> = 1,25 МэВ). Облучение проводили без фантома. Дозы облучения составляли 2, 4, 6 и 8 Гр при мощности дозы ~1 Гр/мин.

## Статистика

Полученные данные обрабатывали при помощи статистического программного обеспечения R версии 3.4.1 с применением пакета «multcomp» и графического приложения Veusz версии 2.0.1 (Jeremy Sanders, GPL). Каждый эксперимент повторяли три раза. При оценке погрешности выживаемости клеток учитывали ошибки при подсчете клеток в камере Горяева, разведении автоматической пипеткой и подсчете количества колоний [10].

## Результаты

### Клоногенная активность клеток, облученных в состоянии монослоя

В первой серии экспериментов были облучены культуральные флаконы с монослоем кле-

ток. В каждой дозе облучили по три флакона в положениях распределенного пика Брэгга, соответствующих трем разным значениям ЛПЭ. Данные по выживаемости клеток меланомы V16, облученных в монослое, представлены на рис. 2.

Применение для полученных данных парного критерия Стьюдента не выявило наличия статистически значимых различий между выживаемостью облученных в проксимальном и дистальном положениях распределенного пика Брэгга клеток меланомы V16 для доз 4, 6 и 8 Гр ( $P > 0,05$ ).

*Клоногенная активность клеток, облученных в состоянии суспензии*

Во второй серии экспериментов облучению подвергли помещенные в водный фантом три микроцентрифужные пробирки с осажденными клетками в трех положениях распределенного пика Брэгга. Полученные данные представлены на рис. 3.

Применение для полученных данных парного критерия Стьюдента не выявило наличия статистически значимых различий между выживаемостью облученных в проксимальном и дистальном положениях распределенного пика Брэгга клеток меланомы V16 для доз 4, 6 и 8 Гр ( $P > 0,05$ ). Таким образом, в обеих сериях экспериментов получен одинаковый результат, несмотря

на различия в условиях самого эксперимента. В первой серии облучали клетки в состоянии монослоя, а плато по дозе формировалось большим набором энергий, чем в исследовании на суспензии клеток.

*Сравнение уровня повреждений ДНК в проксимальном и дистальном положениях*

Изучение равномерности биологической дозы в распределенном пике Брэгга было продолжено с применением метода ДНК-комет. Была проведена оценка повреждения ДНК в клетках, облученных в состоянии суспензии в проксимальном и дистальном положениях распределенного пика Брэгга в дозе 4 Гр. Полученные данные представлены в табл.

Из табл. следует, что доверительные интервалы оцениваемого показателя двух экспериментальных групп не перекрываются. Применение непараметрического критерия U Манна-Уитни указывает на наличие статистически значимого различия между значениями биологической дозы в проксимальном и дистальном положениях: доза выше в проксимальной части распределенного пика Брэгга. Таким образом, полученные данные согласуются с приведенными выше результатами по клоногенной активности клеток и свидетельствуют об отсутствии увеличения биологической дозы в дистальной части распределенного пика Брэгга.

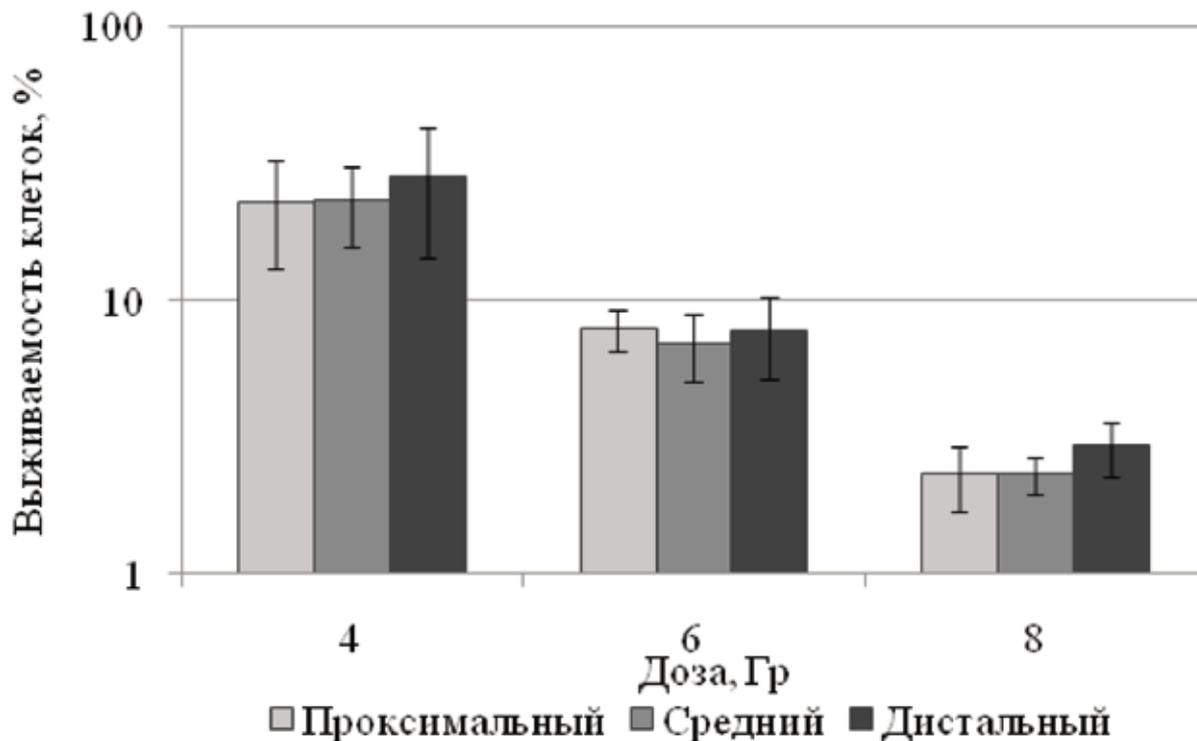


Рис. 2. Выживаемость клеток линии V16, облученных в состоянии монослоя, в зависимости от положения в распределенном пике Брэгга

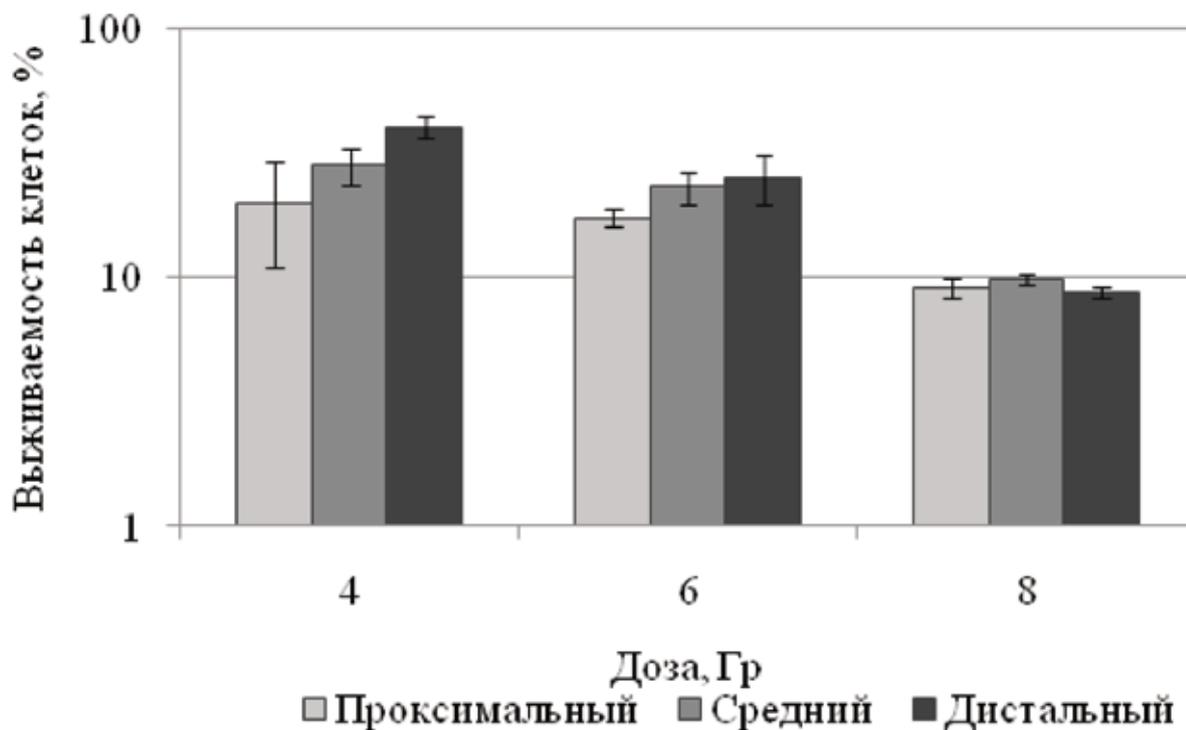


Рис. 3. Выживаемость клеток линии V16, облученных в состоянии суспензии, в зависимости от положения в распределенном пике Брэгга

Таблица. Данные повреждения ДНК в клетках, облученных в проксимальном и дистальном положениях распределенного пика Брэгга в дозе 4 Гр, согласно показателю «момент хвоста»

Положение	M±SE	Дов. интервал	U-критерий Манна-Уитни
Проксимальное	5,55±0,19	5,18÷5,93	P < 0,01
Дистальное	4,49±0,17	4,15÷4,83	

### Обсуждение

В ходе проведенного исследования была изучена равномерность биологической дозы в распределенном пике Брэгга, формируемом сканирующим карандашным пучком установки «Прометеус». Клиническое применение каждой терапевтической установки должно сопровождаться проверкой радиобиологических характеристик формируемого пучка. Matsumoto et al. [6] показали, что для циклотрона NIRS-NIMAC области дистального конца протонных лучей характеризуются высокой эффективностью. ОБЭ составила – 1,5 на уровне выживаемости 10%. Согласно данным, полученным Maeda et al. [5] на установке ProBeat RT (Хитачи, Япония) значение ОБЭ протонов в дистальной области распределенного пика Брэгга составляло 1,5. Схожие результаты были получены в Центре протонной терапии в Праге [7]: в дистальном положении распределенного пика Брэгга значение ОБЭ на 10% уровне выживаемости составило 1,53.

Экспериментальные данные, полученные при облучении клеток меланомы V16 на терапевти-

ческом комплексе протонной терапии со сканирующим пучком, не показали увеличения ОБЭ и, как следствие, биологической дозы в дистальной части распределенного пика Брэгга. Это свидетельствует о корректной работе встроенной системы планирования установки «Прометеус», обеспечивающей стабильный уровень биологической дозы несмотря на повышение ЛПЭ. Этот вывод был справедлив как для монослоя клеток, так и для суспензии. Кроме того, не было обнаружено связи между равномерностью биологической дозы в распределенном пике Брэгга и количеством энергий, формирующих плато по физической дозе. Эти результаты отличаются от данных ряда исследователей, которые указывают на увеличение биологической эффективности в дистальном положении распределенного пика Брэгга для использованных в экспериментах установок.

### Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что сформированный сканирующим пучком протонов установки «Прометеус» распределенный пик Брэгга обеспечивает равномерность биологической дозы по всему объему облучения. Эффекта повышения биологической дозы в дистальной части распределенного пика Брэгга не наблюдается.

### Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Калужской области в рамках научного проекта № 18-44-400012.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА

- Nasedkina N.V., Beketov E.E., Isaeva E.V. et al. RBE of "Prometheus" facility protons for irradiation of tumor cells in vitro with one and three fields // *KnE Engineering*. – 2008. – AtomFuture 2017. – P. 309-316.
- Paganetti H. Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. Variations as a function of biological endpoint, dose, and linear energy transfer // *Phys. Med. Biol.* – 2014. – Vol. 59(22). – P. R419-R472.
- Соловьев А.Н., Гулидов И.А., Мардынский Ю.С. и др. Современные тенденции в мире частиц. Краткие итоги конференции РТСОГ56 // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2017. – Т. 57(5). – С. 548-550.
- Maeda K., Yasui H., Matsuura T. et al. Evaluation of the relative biological effectiveness of spot-scanning proton irradiation in vitro // *J. Radiat. Res.* – 2016. – Vol. 57(3). – P. 307-311.
- Matsumoto Y., Matsuura T., Wada M. et al. Enhanced radiobiological effects at the distal end of a clinical proton beam: in vitro study // *Journal of Radiation Research*. – 2014. – Vol. 55(4). – P. 816-822.
- Michaelidesova A., Vachelova J., Puchalska M. et al. Relative biological effectiveness in a proton spread-out Bragg peak formed by pencil beam scanning mode // *Australas Phys. Eng. Sci. Med.* – 2017. – Vol. 40(2). – P. 359-368.
- Бекетов Е.Е., Исаева Е.В., Наседкина Н.В. и др. Биологическая эффективность сканирующего пучка протонов терапевтического комплекса «Прометеус» МРНЦ им. А.Ф. Цыба в исследованиях на культуре клеток мышиной меланомы В-16 // *Вопросы онкологии*. – 2018. – Т. 64. – №5. – С. 678-682.
- Olive P.L., Banath J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells // *Nat. Protoc.* – 2016. – Vol. 1(1). – P. 23-29.
- Ульяненко С.Е., Лычагин А.А., Корякин С.Н. и др. Распределения дозы и ЛПЭ в биообъектах при облучении протонами // *Медицинская физика*. – 2018. – № 1. – С. 68-74.
- Бекетов Е.Е., Исаева Е.В., Трошина М.В. и др. Результаты предварительных исследований биологической эффективности пучка ионов углерода ускорителя У-70 // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2017. – Том. 57(5). – С. 462-470.

Поступила в редакцию 25.03.2019 г.

*E.E. Beketov<sup>1</sup>, E.V. Isaeva<sup>1</sup>, N.V. Nasedkina<sup>1</sup>,  
A.N. Solovov<sup>1</sup>, O.Y. Golovanova<sup>1</sup>, L.N. Ulyanenko<sup>1</sup>,  
E.P. Malakhov<sup>1</sup>, A.A. Kisel<sup>1</sup>, S.E. Ulyanenko<sup>1</sup>,  
P.V. Shegai<sup>2</sup>, S.A. Ivanon<sup>1</sup>, A.D. Kaprin<sup>2</sup>*

### Biological dose uniformity in spread-out Bragg peak of proton scanning beam therapeutic facility

<sup>1</sup>A. Tsyb MRRC – branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
<sup>2</sup>FSBI NMRRС of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk

**Introduction.** Biological dose uniformity in SOBP of the modern proton therapy facilities is an important issue. The results of a number of studies reveal an increased biological efficiency at the distal area of SOBP. The aim of the study was to verify this effect for Prometheus facility, which provides proton therapy with a scanning pencil beam.

**Material and methods.** The study was conducted at A. Tsyb MRRC. Melanoma B16F10 cells were used for the experiments. The biological efficacy of protons was evaluated by clonogenic assay (cell survival) and comet assay (DNA damage). Proton dose range within the experiments was 4-8 Gy. Cells were irradiated both in monolayer and suspension conditions. Proton biological efficacy along SOBP was evaluated in the proximal, middle and distal positions. All irradiations were carried out with one field.

**Results** of in vitro experiments indicate that Prometheus facility treatment planning system in case of single-field irradiation provides the uniformity of the biological dose in SOBP. According to cell survival, there is a tendency for a slightly greater efficiency of protons in the proximal part of SOBP. Data on DNA damage confirm this conclusion.

**Conclusion.** Therefore, unlike a number of modern installations for proton therapy in the case of the facility used in the study, there is no increase of biological dose in the distal area of SOBP.

Key words: proton therapy, scanning beam, SOBP, RBE, LET, melanoma B16