

УДК 577.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ A549 ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ПРОТОННЫМ ПУЧКОМ ВО ФЛЭШ- И СТАНДАРТНОМ РЕЖИМАХ

© 2024 г. А.В. Рзянина<sup>\*,#</sup>, Г.В. Мицын<sup>\*</sup>, А.В. Агапов<sup>\*</sup>, Е.А. Грицкова<sup>\*</sup>, С.С. Углова<sup>\*</sup>, В.Н. Гаевский<sup>\*</sup>, К.Н. Шипулин<sup>\*</sup>, И. Хасенова<sup>\*</sup>

*\*Объединенный институт ядерных исследований, ул. Жолио-Кюри, 6, Дубна Московской области, 141980, Россия  
E-mail: rzjanina@mail.ru*

Поступила в редакцию 30.06.2023 г.

После доработки 10.07.2023 г.

Принята к публикации 12.07.2023 г.

Флэш-терапия – инновационный метод облучения, который обеспечивает подведение лечебной дозы к патологическому очагу за времена порядка нескольких десятков миллисекунд. В таком режиме облучения уменьшается степень повреждения нормальных тканей, окружающих опухоль и попадающих под действие излучения, в то же время воздействие на раковые клетки сохраняется практически на прежнем уровне, что улучшает перспективу локального контроля опухоли при меньшей частоте возникновения побочных эффектов. На сегодняшний день точные радиобиологические механизмы, лежащие в основе флэш-эффекта, до конца неясны. В статье приведены результаты работы по формированию высокоинтенсивного пучка протонов с энергией 660 МэВ от ускорителя «фазотрон» Объединенного института ядерных исследований (Дубна), предназначенного для проведения радиобиологических исследований при облучении методом флэш-терапии клеточных культур и малых лабораторных животных (мыши, крысы). Также проведено сравнение выживаемости клеток линии A549 при облучении протонным пучком в двух режимах: флэш и стандартном. Обнаружено различие в изменении выживаемости клеток A549, облученных в флэш- и стандартном режимах. Величина флэш-эффекта представлена фактором изменения дозы.

*Ключевые слова: протонная терапия, флэш-эффект, облучение сверхвысокой мощностью дозы, клоногенная выживаемость, культура клеток A549.*

DOI: 10.31857/S0006302924020158, EDN: OTSRTL

Основной проблемой лучевой терапии является тот факт, что она может наносить вред окружающим опухоль здоровым тканям. Поэтому подводимая к опухоли доза ограничена ее токсичностью для близлежащих здоровых биологических структур. Это может привести к снижению эффективности проводимой лучевой терапии и неполному уничтожению опухоли. Исходя из этого, в основе методов лучевой терапии лежат принципы, учитывающие различия в реакции на облучение между нормальными и опухолевыми тканями, а также подходы, обеспечивающие сохранение здоровых тканей на приемлемом уровне. Для достижения этой цели можно варьировать параметрами облучения: величиной поглощенной дозы, мощностью дозы, использовать фракционирование дозы и совершенствовать способы доставки дозы в опухоль.

Допустимая величина поглощенной в опухоли дозы определяется как максимально переноси-

мая доза, которая может быть доставлена в опухоль безопасно для здоровых тканей. Для уменьшения частоты возникновения радиационно-индуцированных побочных эффектов можно применять фракционирование дозы. Наиболее перспективным методом доставки излучения в опухоль является протонная терапия, обеспечивающая высокую конформность дозных распределений форме опухоли, что позволяет уменьшить лучевую нагрузку на нормальные ткани. Наряду с усовершенствованием методов способа доставки дозы в опухоль и режимов фракционирования до недавнего времени недостаточно внимания уделялось возможности модификации мощности дозы. Однако сегодня все больше исследований проводится в новой области, получившей название «флэш-терапия».

Этот метод предполагает подведение терапевтической дозы облучения к опухолевому объему при сверхвысокой мощности дозы в пучке, на не-

сколько порядков превышающей обычно используемую при стандартной радиотерапии. Исследования показывают, что флэш-терапия, по сравнению со стандартной радиотерапией, позволяет уменьшать степень повреждения нормальных тканей, окружающих опухоль и попадающих под действие излучения, в то же время воздействие на раковые клетки сохраняется на прежнем уровне, что улучшает перспективу локального контроля опухоли при меньшей частоте возникновения побочных эффектов [1–5].

Первые сообщения об исследовании сверхвысоких мощностей дозы при облучении биологических объектов появились в научной литературе еще в 70-х годах прошлого века [6–8], однако массово эти исследования стали проводиться в различных центрах после опубликования в 2014 г. работы В. Фаводона с соавторами из Института Кюри (Париж, Франция) [2], которые предложили использовать этот эффект в дистанционной лучевой терапии.

В настоящее время получены определенные результаты, в частности, показано что флэш-терапия эффективно снижает токсичность в легких [2, 9] кишечнике [10], головном мозге [11] и коже [12], а также позволяет сохранять противоопухолевый эффект в раковых клетках [9, 13, 14].

Следует отметить, что на сегодняшний день биологические механизмы флэш-эффекта досконально не изучены. Среди авторитетных ученых в области радиобиологии мнения о перспективах использования этого эффекта в клинической практике, как и о реальности существования самого эффекта, сильно рознятся. Некоторые из них сомневаются в возможности существования флэш-эффекта, другие же, наоборот, считают, что данный эффект в будущем позволит заменить мелкофракционированные курсы дистанционной лучевой терапии на одно- или двукратные облучения при сохранении или даже увеличении эффективности лечения. Действительно, на сегодняшний день не существует однозначной теории, способной объяснить механизм возникновения флэш-эффекта, но то, что он реально существует доказывают многочисленные исследования, проводимые во множестве научно-исследовательских центров на различных радиобиологических моделях [15].

Более того, ведущие мировые фирмы, производящие оборудование для центров протонной терапии «под ключ» (Varian, IBA, США), с недавнего времени приступили к модернизации выпускаемого ими оборудования для возможности проведения протонной флэш-терапии. Уже начаты первые клинические исследования по эффективности ее использования [16].

Не так давно было создано международное общество (<https://frpt-conference.org/about-frpt/>),

объединившее ученых из разных стран, занимающихся исследованиями в области флэш-терапии с применением различных ионизирующих излучений.

В настоящее время отличия эффектов при облучении в стандартном и флэш-режимах объясняют различиями в физико-химических реакциях, возникающих после облучения. Воздействие ионизирующего излучения на биологические системы приводит к очень быстрым физическим и химическим изменениям, которые впоследствии преобразуются в биологические повреждения. Одним из основных следствий облучения является ионизация воды и образование свободных радикалов, которые взаимодействуют с ключевыми биологическими мишенями. Присутствие кислорода увеличивает вероятность фиксации повреждений, вызванных радикалами. На данный момент основными версиями объяснения флэш-эффекта являются: истощение кислорода в облучаемых здоровых тканях; метаболизм перекисных соединений и химия Фентона, а также рекомбинация свободных радикалов.

**Истощение кислорода.** Кислород играет роль сенсibilизатора при радиационном воздействии. По сравнению с испытывающими гипоксию опухолевыми клетками богатая кислородом здоровая ткань имеет более высокую радиочувствительность при тех же условиях облучения. Поскольку при флэш-режиме облучение происходит за очень короткое время (миллисекунды) по сравнению со стандартной терапией (минуты), в самом начале облучения кислород в ткани быстро истощается, а реоксигенация не может произойти слишком быстро. После того как уровень кислорода был истощен, последующее облучение нормальной ткани происходит в гипоксических условиях, т.е. в резистентном состоянии [17]. По этой причине в нормальных тканях наблюдается более выраженное снижение уровня кислорода по сравнению с опухолевыми после облучения в флэш-режиме [18].

**Метаболизм перекисных соединений и химия Фентона.** Некоторые авторы считают, что опухолевые и нормальные клетки имеют разную способность удалять продукты реакций перекиси водорода [19]. Клетки здоровой ткани имеют меньшую окислительную нагрузку по сравнению с опухолевыми клетками. Кроме того, содержание лабильного железа в нормальных тканях также ниже, что предотвращает повреждение здоровых тканей в результате реакции Фентона. Нормальные ткани имеют более высокую антиоксидантную способность, следовательно, они будут быстрее удалять продукты реакций перекиси водорода.

**Рекомбинация свободных радикалов.** В нормоксических условиях при сверхвысоких мощностях

доз было обнаружено, что отдельные активные формы кислорода агломерируются с образованием резонансных или метастабильных молекулярных состояний, связанных водородными связями. Полученные агломерации обладают низкой диффузионной способностью и, следовательно, становятся неактивными формами кислорода с ограниченным потенциалом биологического повреждения. Наблюдаемая агломерация и возникающая в результате этого защита нормальных тканей при сверхвысоких дозах является потенциальным преимуществом при флэш-терапии [20, 21]

**Формирование пучка протонов для облучения в флэш-режиме.** Объединенный институт ядерных исследований (ОИЯИ, Дубна, Московская обл.) является одним из пионеров в исследовании эффективности применения протонных пучков для радиотерапии [22]. Здесь накоплен богатый опыт проведения трехмерной конформной протонной терапии онкологических больных. С 2000 по 2019 г. на пучках ускорителя фазотрона прошли курс облучения около 1300 пациентов с различными заболеваниями.

На сегодняшний день ОИЯИ совместно с НИИЭФА им. Д.В. Ефремова (Санкт-Петербург) уже приступили к реализации проекта создания сверхпроводящего изохронного циклотрона MSC230, на котором планируется проведение научных исследований, а также работ по развитию методик протонной флэш-терапии [23]. Для этого в конструкцию будущего ускорителя закладывается возможность работы в импульсном режиме с силой выходного тока пучка до 10 мкА и длительностью импульса до 10–200 мс. Это позволит формировать равномерные по дозе высокоэнергетичные (100–230 МэВ) протонные пучки с мгновенной мощностью дозы до 100 Гр/с и диаметром в изоцентре облучения до 10–15 см. Такие параметры пучка дадут возможность в будущем использовать этот ускоритель при проведении клинических исследований по применению методик протонной флэш-терапии для лечения широкого круга локализаций.

Пилотные работы по исследованию флэш-эффекта были начаты в ОИЯИ еще в 2020 г. на пучке действующего ускорителя фазотрона с энергией протонов 660 МэВ и максимальным током 1 мкА. С этой целью был сформирован однородный в сечении протонный пучок с диаметром около 45 мм (по 90 % изодозе) и с мощностью дозы 70 Гр/с.

Были также спроектированы, изготовлены и успешно испытаны две ионизационные камеры для мониторинга интенсивности пучка и измерения его горизонтального и вертикального профилей, разработано программное обеспечение для экспресс-обработки отсканированных изображений с радиохромных пленок. Все это

позволило начать проведение исследований флэш-эффекта при облучении как клеточных культур, так и малых лабораторных животных (мышей, крыс). Кроме того, такой высокоинтенсивный пучок полезен при тестировании различных создаваемых детекторов для дозиметрии в условиях сверхвысоких мощностей дозы, что является крайне актуальным для реализации будущего проекта.

В итоге была определена основная цель работы – облучение клеточных культур карциномы легкого человека линии A549 протонным пучком в двух режимах – стандартном и флэш-режиме.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Облучение протонами.** Облучение культуры клеток A549 проводили на протонном пучке 660 МэВ фазотрона ОИЯИ методом «на пролет» в двух режимах – стандартном, при мощности дозы около 0.1 Гр/с, и в флэш-режиме, при мощности дозы 70 Гр/с (см. рис. 1). Остальные параметры пучка были одинаковы для обоих режимов облучения.

**Клеточная культура.** Клетки карциномы легкого человека A549 культивировали в чашках Петри либо в культуральных флаконах в зависимости от задачи эксперимента. Клетки инкубировали в стандартных условиях (37.0°C, 5% CO<sub>2</sub>). Для культивирования использовалась питательная среда Игла MEM с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамин, пенициллин-стрептомицин (50 ед./мл).

**Определение клоногенной выживаемости клеток.** Клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером, снимали с культурального флакона с помощью раствора трипсин-версена, ресуспендировали в эппендорфы и облучали протонами в дозе 0, 0.5, 1, 2, 4 и 6 Гр. Затем клетки высевали в культуральные флаконы из расчета 50 клеток/мл среды. Клетки культивировали в стандартных условиях в течение времени, необходимого для формирования колоний. Далее клетки промывали фосфатно-солевым буфером и окрашивали смесью метанола и кристаллического фиолетового в течение 30 мин при комнатной температуре. Для определения выживаемости клеток через 12–14 суток после посева подсчитывали количество выросших колоний, где каждая колония считается представляющей выжившую клетку, способную к пролиферации. Для определения выживаемости рассчитывали по формуле (1) эффективность посева ( $\mathcal{E}П$ ) для облученных и необлученных клеток:

$$\mathcal{E}П = \frac{\text{Число выросших колоний}}{\text{Число посеянных клеток}} \times 100\%. \quad (1)$$



Рис. 1. Установка для облучения биологических образцов методом «на пролет».

Далее по формуле (2) рассчитывали выживаемость ( $S$  – survival):

$$S = \frac{\text{ЭП}_{\text{облученных клеток}}}{\text{ЭП}_{\text{контрольных клеток}}} \times 100\%. \quad (2)$$

**Статистическая обработка.** Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft, США). Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартное отклонение. Сравнение групп данных проводили с помощью  $t$ -критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполнения поставленных задач был сформирован протонный пучок (рис. 2), однородный в сечении (в пределах  $\pm 5\%$ ) с диаметром плоской части 45–47 мм, при этом мощность дозы можно было варьировать параметрами ускорителя от 0.05 Гр/с до 70–75 Гр/с. Для получения информации о поперечном распределении пучка использовали радиохромную пленку ЕВТ-3 [24] и специально разработанное программное обеспечение для экспресс-обработки информации со сканов облученной пленки, а также созданную пиксельную ионизационную камеру с малым межэлектродным зазором.

Предписанная доза отпускалась по показаниям специально созданной мониторинговой плоскопараллельной ионизационной камеры, работающей в линейном режиме для всего диапазона используемых мощностей дозы. Предварительно эту камеру в начале сеанса работы калибровали на протонном пучке с помощью клинического дозиметра Unidos E с плоскопараллельной ионизационной камерой Markus производства фирмы PTW

(Freiburg, Германия) [25] при стандартной мощности дозы.

На рис. 3 представлены результаты экспериментов по изучению изменения клоногенной выживаемости клеток линии А549 при облучении в нормоксических условиях в стандартном и флэш-режиме. Было обнаружено незначительное различие в изменении выживаемости клеток А549, облученных в флэш- и стандартном режимах. Следует отметить, что статистически значимый уровень различий ( $p < 0.05$ ) появляется только при больших дозах (4 и 6 Гр), а в диапазоне доз до 2 Гр планки погрешностей пересекаются, статистически значимые различия между кривыми не обнаружены. Тем не менее если рассматривать общую тенденцию по всем точкам, то отчетливо видно, что облучение протонами при сверхвысокой мощности дозы снижает выживаемость клеток карциномы легкого человека линии А549 меньше, чем при облучении в стандартном режиме. В данной работе величина флэш-эффекта представлена фактором изменения дозы. Фактор изменения дозы определялся как отношение

$\frac{\text{Доза флэш}}{\text{Доза стандарт}}$  для 10%-го уровня выживаемости.

Для данных исследований он составил 1.1. Такое значение не противоречит данным других исследовательских групп, где фактор изменения дозы обычно составлял 1.1–1.5 [26]. Анализ работ *in vivo* свидетельствует о том, что облучение во флэш-режиме способствует сохранению нормальных тканей [2, 4, 27–29]. Однако результаты исследования клоногенной выживаемости *in vitro* при нормоксических условиях облучения носят противоречивый характер как в последних работах [18, 30–32], так и в более ранних исследованиях [33–38].

С полученными нами данными, а именно, более высоким уровнем выживаемости при облуче-

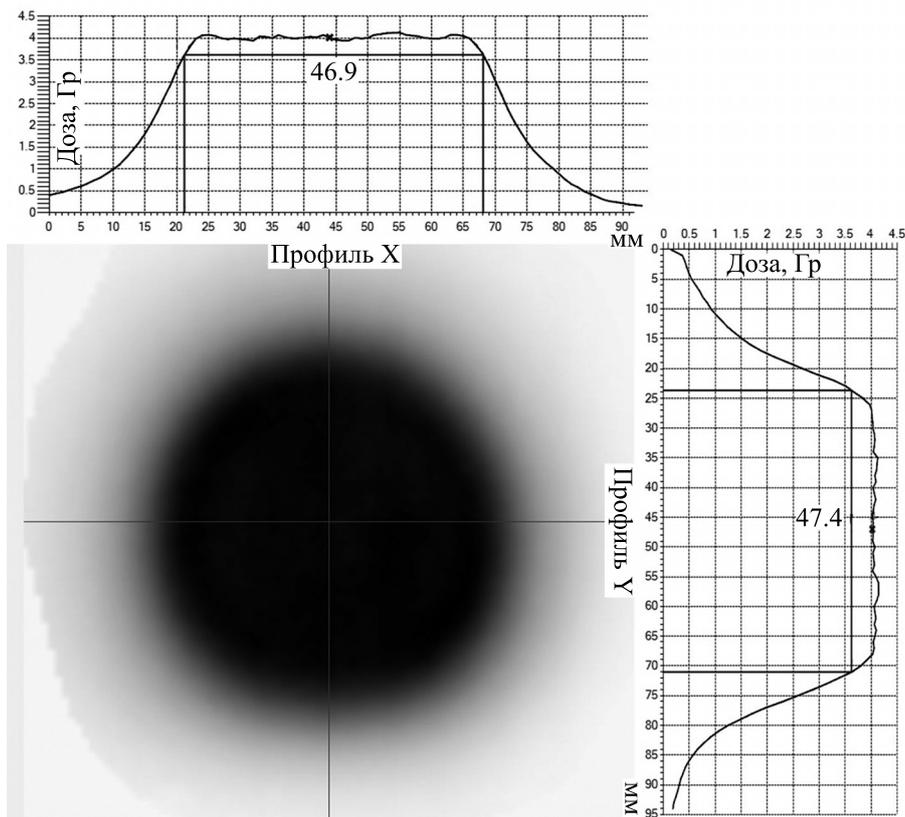


Рис. 2. Восстановленные горизонтальный и вертикальный профили сформированного протонного пучка, полученные с помощью радиохромной пленки.

нии со сверхвысокой мощностью дозы, согласуются работы [18, 28, 37–41], но следует отметить, что есть и другие результаты, указывающие на отсутствие различий [30, 31, 33–36] или даже на обратный эффект [42]. Наличие противоречивых

результатов требует дальнейшего более детального исследования этой проблемы.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на наличие противоречивых результатов в различных исследовательских группах, дальнейшее изучение флэш-эффекта представляет огромный теоретический и практический интерес. Применение флэш-режима в радиотерапии может минимизировать повреждения здоровой ткани и сократить количество фракций облучения. Тем не менее на данный момент отсутствует хорошо проработанное представление о механизме действия флэш-эффекта. Необходимы дальнейшие исследования, которые помогут прояснить его радиобиологический механизм. Также следует уделить особое внимание разработке специального оборудования и средств дозиметрии для проведения экспериментов в режиме флэш-облучения.

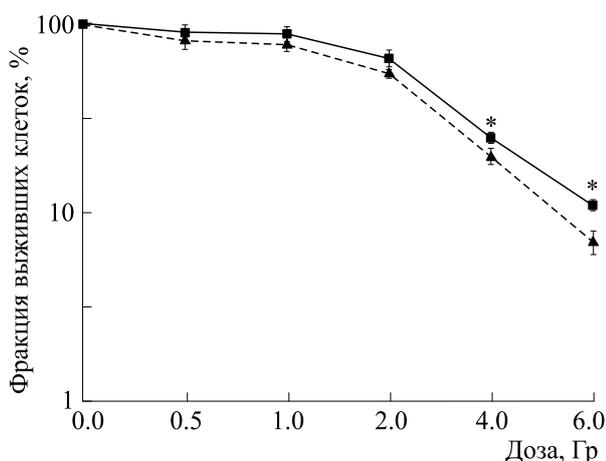


Рис. 3. Кривые выживаемости клеток линии A549 при облучении в двух режимах: стандартном и флэш (\* –  $p < 0.05$ ).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Favaudon V., Labarbe R., and Limoli C. L. Model studies of the role of oxygen in the FLASH effect. *Med. Phys.*, **49** (3), 2068 (2022).
- Favaudon V., Caplier L., Monceau V., Pouzoulet F., Sayarath M., Fouillade C., Poupon M. F., Brito I., Hupé P., Bourhis J., Hall J., Fontaine J. J., and Vozenin M. C. Ultrahigh dose-rate flash irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice, *Sci. Transl. Med.*, **6** (245), 245ra93 (2014). DOI: 10.1126/scitranslmed.3008973
- Fouillade C., Curras-Alonso S., Giuranno L., Quelenec E., Heinrich S., Bonnet-Boissinot S., Beddok A., Leboucher S., Karakurt H. U., Bohec M., Baulande S., Vooijs M., Verrelle P., Dutreix M., Londoño-Vallejo A., and Favaudon V. FLASH irradiation spares lung progenitor cells and limits the incidence of radio-induced senescence. *Clin. Cancer Res.*, **26** (6), 1497–1506 (2020). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1440
- Vozenin M. C., De Fornel P., Petersson K., Favaudon V., Jaccard M., Germond J. F., Petit B., Burki M., Ferrand G., Patin D., Bouchaab H., Ozsahin M., Bochud F., Bailat C., Devauchelle P., and Bourhis J. The advantage of FLASH radiotherapy confirmed in minipig and cat-cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, **25** (1), 35–42 (2019). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3375
- Bourhis J., Sozzi W. J., Jorge P. G., Gaide O., Bailat C., Duclos F., Patin D., Ozsahin M., Bochud F., Germond J. F., Moeckli R., and Vozenin M. C. Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy. *Radiother. Oncol.*, **139**, 18–22 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.019
- Hornsey S. and Bewley D. K. Hypoxia in mouse intestine induced by electron irradiation at high dose-rates. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem., Med.*, **19** (5), 479 (1971).
- Weiss H., Epp E. R., Heslin J. M., Ling C. C., and Santomaso A. Oxygen depletion in cells irradiated at ultrahigh dose-rates and at conventional dose-rates. *Int. J. Radiat. Biol.*, **26** (1), 17–29 (1974). DOI: 10.1080/09553007414550901
- Epp E. R., Weiss H., Djordjevic B., and Santomaso A. The radiosensitivity of cultured mammalian cells exposed to single high intensity pulses of electrons in various concentrations of oxygen. *Radiat. Res.*, **52** (2), 324 (1972).
- Gao F., Yang Y., Zhu H., Wang J., Xiao D., Zhou Z., Dai T., Zhang Y., Feng G., Li J., Lin B., Xie G., Ke Q., Zhou K., Li P., Shen X., Wang H., Yan L., Lao C., Shan L., Li M., Lu Y., Chen M., Feng S., Zhao J., Wu D., and Du X. First demonstration of the FLASH effect with ultrahigh dose rate high-energy X-rays. *Radiother. Oncol.*, **166**, 44–50 (2022). DOI: 10.1016/j.radonc.2021.11.004
- Loo B. W., Schuler E., Lartey F. M., Rafat M., King G. J., Trovati G. J., Koong A. C., and Maxim P. G. Delivery of ultra-rapid flash radiation therapy and demonstration of normal tissue sparing after abdominal irradiation of mice, *Int. J. Radiat. Oncol.*, **98**, E16 (2017).
- Simmons D. A., Lartey F. M., Schüler E., Rafat M., King G., Kim A., Ko R., Semaan S., Gonzalez S., Jenkins M., Pradhan P., Shih Z., Wang J., von Eyben R., Graves E. E., Maxim P. G., Longo F. M., and Loo B. W., Jr. Reduced cognitive deficits after FLASH irradiation of whole mouse brain are associated with less hippocampal dendritic spine loss and neuroinflammation. *Radiother. Oncol.*, **139**, 4–10 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.006
- Singers S. B., Krzysztosf S. M., Ankjærgaard C., Johansen J., Andersen C. E., Kanouta E., Overgaard C., Grau C., and Poulsen P. In vivo validation and tissue sparing factor for acute damage of pencil beam scanning proton FLASH, *Radiother. Oncol.*, **167**, 109–115 (2022). DOI: 10.1016/j.radonc.2021.12.022
- Montay-Gruel P., Acharya M. M., Gonçalves Jorge P., Petit B., Petridis I. G., Fuchs P., Leavitt R., Petersson K., Gondré M., Ollivier J., Moeckli R., Bochud F., Bailat C., Bourhis J., Germond J. F., Limoli C. L., and Vozenin M. C. Hypofractionated FLASH-RT as an Effective Treatment against Glioblastoma that Reduces Neurocognitive Side Effects in Mice. *Clin. Cancer Res.*, **27** (3), 775–784 (2021). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0894
- Levy K., Natarajan S., Wang J., Chow S., Eggold J. T., Loo P. E., Manjappa R., Melemenidis S., Lartey F. M., Schüler E., Skinner L., Rafat M., Ko R., Kim A., H Al-Rawi D., von Eyben R., Dorigo O., Casey K. M., Graves E. E., Bush K., Yu A. S., Koong A. C., Maxim P. G., Loo B. W. Jr, Rankin E. B. Abdominal FLASH irradiation reduces radiation-induced gastrointestinal toxicity for the treatment of ovarian cancer in mice. *Sci Rep.*, **10** (1), 21600 (2020). DOI: 10.1038/s41598-020-78017-7
- Вайнсон А. А. и Соловьева Е. В., Флэш-эффект в лучевой терапии злокачественных новообразований и поиски его радиобиологического объяснения. *Онкологич. журн.: лучевая диагностика, лучевая терапия*, **5** (4), 9 (2022).
- Bourhis J., Sozzi W. J., Jorge P. G., Gaide O., Bailat C., Duclos F., Patin D., Ozsahin M., Bochud F., Germond J. F., Moeckli R., and Vozenin M. C. Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy.

- Radiother. Oncol.*, **139**, 18–22 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.019
17. Durante M., Bräuer-Krisch E., and Hill M. Faster and safer? FLASH ultra-high dose rate in radiotherapy. *Br. J. Radiol.*, **91**, 20170628 (2018).
  18. Adrian G., Konradsson E., Lempart M., Bäck S., Ceberg C., and Petersson K. The FLASH effect depends on oxygen concentration, *Br. J. Radiol.*, **93**, 20190702 (2020).
  19. Spitz D. R., Buettner G. R., Petronek M. S., St-Aubin J. J., Flynn R. T., Waldron T. J., and Limoli C. L., An integrated physico-chemical approach for explaining the differential impact of FLASH versus conventional dose rate irradiation on cancer and normal tissue responses. *Radiother. Oncol.*, **139** (16), 23 (2019).
  20. Petersson K., Adrian G., Butterworth K., and McMahon S. J. A quantitative analysis of the role of oxygen tension in flash radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **107**, 539 (2020).
  21. Wardman P. Radiotherapy using high-intensity pulsed radiation beams (flash): a radiation-chemical perspective. *Radiat. Res.*, **194**, 607 (2020).
  22. Агапов А. В., Гаевский В. Н., Лучин Е. И., Мицын Г. В., Молоканов А. Г., Цейтлина М. А., Швидкий С. В. и Шипулин К. Н. 50 лет со дня облучения первого пациента протонным пучком в Объединенном институте ядерных исследований (Дубна). *Мед. физика*, **4** (76), 121 (2017).
  23. Карамышев В., Бунятов К. С., Гибинский А. Л., Гурский С. В., Карамышева Г. А., Ляпин И. Д., Малинин В. А., Попов Д. В., Ширков Г. Д. и Ширков С. Г. Исследования и разработка сверхпроводящего циклотрона SC230 для протонной терапии. *Письма в ЭЧАЯ*, **18** (1), 73 (2021).
  24. Официальный сайт GafChromic. URL: <http://www.gafchromic.com/>
  25. Официальный сайт PTW The Dosimetry Company. URL: <https://www.ptwdosimetry.com/en>
  26. Wilson J. D., Hammond E. M., Higgins G. S., and Petersson K. Ultra-high dose rate (flash) radiotherapy: silver bullet or fool's gold? *Front. Oncol.*, **9**, 1563 (2020).
  27. Montay-Gruel P., Petersson K., Jaccard M., Boivin G., Germond J.-F., Petit B., Doenlen R., Favaudon V., Bochud F., Bailat C., Bourhis J., Vozenin M. C. Irradiation in a flash: unique sparing of memory in mice after whole brain irradiation with dose rates above 100 Gy/s, *Radiother. Oncol.*, **124**, 365–369 (2017). DOI: 10.1016/j.radonc.2017.05.003
  28. Montay-Gruel P., Acharya M. M., Petersson K., Alikhani L., Yakkala C., Allen B. D., Ollivier J., Petit B., Jorge P. G., Syage A. R., Nguyen T. A., Baddour A. A. D., Lu C., Singh P., Moeckli R., Bochud F., Germond J. F., Froidevaux P., Bailat C., Bourhis J., Vozenin M. C., and Limoli C. L. Long-term neurocognitive benefits of FLASH radiotherapy driven by reduced reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116** (22), 10943–10951 (2019). DOI: 10.1073/pnas.1901777116
  29. Fouillade C., Curras-Alonso S., Giuranno L., Quelenec E., Heinrich S., Bonnet-Boissinot S., Beddok A., Leboucher S., Karakurt H. U., Bohec M., Baulande S., Vooijs M., Verrelle P., Dutreix M., Londoño-Vallejo A., and Favaudon V. FLASH irradiation spares lung progenitor cells and limits the incidence of radio-induced senescence. *Clin. Cancer Res.*, **26** (6), 1497–1506 (2020). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1440
  30. Buonanno M., Grilj V., and Brenner D. J. Biological effects in normal cells exposed to flash dose rate protons. *Radiother. Oncol.*, **139**, 51 (2019).
  31. Khan S., Bassenne M., Wang J., Manjappa R., Melemenidis S., Breikreutz D. Y., Maxim P. G., Xing L., Loo B. W. Jr, and Pratz G. Multicellular Spheroids as In Vitro Models of Oxygen Depletion During FLASH Irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **110** (3), 833–844 (2021). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2021.01.050
  32. Venkatesulu B. P., Sharma A., Pollard-Larkin J. M., Sadagopan R., Symons J., Neri S., Singh P. K., Taylor R., Lin S. H., and Krishnan S. Ultra high dose rate (35Gy/sec) radiation does not spare the normal tissue in cardiac and splenic models of lymphopenia and gastrointestinal syndrome. *Sci Rep.*, **9** (1), 17180 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-53562-y
  33. Cygler J., Klassen N. V., Ross C. K., Bichay T. J., and Raaphorst G. P. The survival of aerobic and anoxic human glioma and melanoma cells after irradiation at ultrahigh and clinical dose rates, *Radiat. Res.*, **140**, 79 (1994).
  34. Zackrisson B. U., Nystrom U. H., and Ostbergh P. Biological response in vitro to pulsed high dose rate electrons from a clinical accelerator. *Acta. Oncol. (Madrid)*, **30**, 747 (1991).
  35. Nias A. H. W., Swallow A. J., Keene J. P., and Hodgson B. Survival of HeLa cells from 10 nanosecond pulses of electrons, *Int. J. Radiat. Biol.*, **17**, 595 (1970).
  36. Berry R. J. and Stedeford J. B. H. Reproductive survival of mammalian cells after irradiation at ultra-high dose-rates: further observations and their importance for radiotherapy. *Br. J. Radiol.*, **45**, 171 (1972).
  37. Town C. D. Effect of high dose rates on survival of mammalian cells. *Nature*, **215**, 847 (1967).
  38. Berry R. J., Hall E. J., Forster D. W., Storr T. H., and Goodman M. J. Survival of mammalian cells exposed to x rays at ultra-high dose-rates. *Br. J. Radiol.*, **42**, 102 (1969).
  39. Guo Z., Buonanno M., Harken A., Zhou G., and Hei T. K. Mitochondrial damage response and fate of normal cells exposed to flash irradiation with protons. *Radiat. Res.*, **197** (6), 569 (2022).

40. Adrian G., Konradsson E., Beyer S., Wittrup A., Butterworth K. T., McMahon S. J., Ghita M., Petersson K., Ceberg C. Cancer cells can exhibit a sparing flash effect at low doses under normoxic in vitro-conditions. *Front. Oncol.*, **29** (7), 686142 (2021).
41. Auer S., Hable V., Greube C., Drexler G. A., Schmid T. E., Belka C., Dollinger G., Friedl A. A. Survival of tumor cells after proton irradiation with ultra-high dose rates. *Radiat. Oncol.*, **6**, 139 (2011). DOI: 10.1186/1748-717X-6-139
42. Venkatesulu B. P., Sharma A., Pollard-Larkin J. M., Sadagopan R., Symons J., Neri S., Singh P. K., Tailor R., Lin S. H., and Krishnan S. Ultra high dose rate (35Gy/sec) radiation does not spare the normal tissue in cardiac and splenic models of lymphopenia and gastrointestinal syndrome. *Sci Rep.*, **9** (1), 17180 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-53562-y

## Research on Survival of A549 Tumor Cells Following Proton Beam Irradiation Using FLASH Radiotherapy and Conventional Dose Rate Irradiation

A.V. Rzyanina\*, G.V. Mytsin\*, A.V. Agapov\*, E.A. Gritskova\*, S.S. Uglova\*, V.N. Gaevsky\*, K.N. Shipulin\*, and I. Khassenova\*

*\*Joint Institute for Nuclear Research, ul. Joliot-Curie 6, Dubna, Moscow Region, 141980 Russia*

FLASH radiotherapy is the innovative radiotherapy technique in which the short treatment times, few tens of milliseconds, are used to deliver a therapeutic dose of radiation to the tumor. This novel approach reduces damage and minimizes the dose to normal tissues surrounding the tumor and to tissues that are affected by radiation, whilst maintaining the treatment effect on cancer cells. This regimen may improve the level of local control of the tumor and lower the occurrence of side effects. To date, the exact radiobiological mechanisms underpinning the FLASH effect are not completely understood. The paper presents the results on the delivery of a high-intensity proton beam at an energy of 660 MeV produced by Phasotron, a proton accelerator at the Joint Institute for Nuclear Research, Dubna. This proton beam has been created to perform radiobiological studies involving cell cultures and small laboratory animals (mice, rats) using FLASH radiation. Also, the survival rates were compared between A549 cells irradiated at extremely high dose rates (FLASH technique) and those exposed to conventional irradiation with the lower dose rate. It was found that there is a difference between these groups of A549 cells in the survival rates. The magnitude of the FLASH effect is represented by a factor of different dose rates.

*Keywords: proton therapy, flash effect, ultrahigh dose rate irradiation, clonogenic cell survival assay, cell culture A 549*