

ГИПОФРАКЦИОНИРОВАННОЕ ОБЛУЧЕНИЕ СОЛИДНОЙ ФОРМЫ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ ТОНКИМ СКАНИРУЮЩИМ ПУЧКОМ ПРОТОНОВ

© 2016 г. В.Е. Балакин, А.Е. Шемяков, С.И. Заичкина*, О.М. Розанова*, Е.Н. Смирнова*, С.П. Романченко*, С.С. Сорокина*, Н.С. Стрельникова

*Физико-технический центр Физического института им. П.Н. Лебедева РАН,
142280, Протвино Московской области, Академический проезд, 2/110*

E-mail: balakin@vlepp.serpukhov.su

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3*

E-mail: szaichkina@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.04.16 г.

Изучена динамика роста асцитной карциномы Эрлиха у мышей линии SHK при гипофракционированном высокодозном режиме облучения тонким сканирующим пучком протонов в зависимости от объема облучения и времени между двумя фракциями в дозе 30 Гр от 4 до 24 ч. Облучение определяемого объема опухоли и планируемого объема мишени осуществляли в пике Брэгга с энергией протонов на выходе ускорителя 85–100 МэВ. Была показана более высокая противоопухолевая эффективность использования гипофракционирования при облучении определяемого объема опухоли асцитной карциномы Эрлиха по сравнению с планируемым объемом мишени. Наблюдаемый эффект не зависел от интервалов между дозами.

Ключевые слова: гипофракционирование, протонная терапия тонким сканирующим пучком, асцитная карцинома Эрлиха, мыши.

В последнее десятилетие протонная терапия опухолей активно развивается во многих странах мира и рассматривается как альтернатива стандартной лучевой терапии с использованием электронов, гамма- и фотонного излучений [1,2]. Специализированные медицинские центры протонной лучевой терапии занимаются лечением не только достаточно редких опухолей головы и шеи, но и распространенных опухолей простаты и молочной железы [3]. Однако количество таких пациентов несопоставимо с количеством больных, вылеченных с помощью фотонной терапии. Накопленный клинический материал при использовании прогрессивных видов протонных пучков, тем не менее, внушает обоснованный оптимизм для перспективы их более широкого применения [4]. Ограниченность использования протонной терапии связана не только с высокой стоимостью ускорителей протонов, но и весьма незначительным количеством экспериментальных исследований по действию протонов на организмы, и, как следствие, отсутствием знания фундаментальных основ

специфики действия ускоренных частиц на критические структуры и процессы в нормальной и злокачественной клетках [5–7].

Особенностями радиобиологического действия адронов (протонов, нейтронов, ионов углерода) по сравнению с фотонным излучением являются слабая зависимость от оксигенации тканей, индукция в основном летальных повреждений ДНК, в меньшей степени зависимость от клеточного цикла. Преимущества протонной терапии связаны с их дозовым распределением: относительно низкой дозой на входе и наличием пика Брэгга – максимального энерговыделения в конце пробега частицы на заранее заданной глубине, непосредственно в опухоли, что позволяет не повреждать окружающие здоровые ткани, снижая вероятность побочных лучевых реакций [8]. Несмотря на точную локализацию основной энергии облучения, величина относительной биологической эффективности протонов достаточно низкая и составляет около 1,1–1,6 в зависимости от линейной потери энергии протонов, уровня дозы, чувствительности объекта и используемого теста [1]. Так, в работе [9] три опухолевые клеточные линии (LLC, HepG2, Molt-4) были облучены низкоинтенсив-

Сокращения: GTV – определяемый объем опухоли, PTV – планируемый объем мишени.

ным протоновым пучком (35 МэВ) в широком пике Брэгга *in vitro* и изучена клеточная гибель методами МТТ и ССК-8 через 24 ч после облучения. Клетки линий LLC и HerG2 были чувствительны к протонам при дозах выше 1 Гр, индуцирующих апоптоз, в то время как клетки линии Molt-4 показали более низкую чувствительность. Относительная биологическая эффективность по уровню гибели относительно гамма-лучей варьировала от 1,1 до 2,3 у клеток линий LLC и HerG2, а также от 0,3 до 0,7 в случае клеток линии Molt-4 через 11 дней после облучения.

Становится ясно, что в большинстве случаев при проведении лучевой терапии рекомендации по простому наращиванию дозы радиации являются не вполне оправданными. Так, предположения о необходимости повышения суммарной очаговой дозы до 80 Гр и более при таких различных по своей биологии опухолях, как рак легкого и предстательной железы, по мере накопления экспериментальных данных и клинических наблюдений оказались несостоятельными. Необходимость применения таких больших радиационных нагрузок у больных злокачественными опухолями головы и шеи в период лечения способствовала поиску нетрадиционных режимов фракционирования дозы с целью усиления эффективности. Наибольшее количество работ по нестандартным режимам облучения сделано на больных плоскоклеточным раком головы и шеи [10], а в настоящее время появляется все больше данных о целесообразности гипофракционирования и у больных раком простаты [11].

Наиболее перспективным видом протонной терапии считается метод облучения опухоли тонким сканирующим пучком (*pencil beam scanning*), который повышает коэффициент полезного действия, снижает лучевую нагрузку на кожу и вклад в дозу вторичных частиц [3,12]. Сейчас уже очевидно, что, наряду с техническим совершенствованием ускорителей, заметное преимущество точно локализованных облучений может быть реализовано только при гипофракционированном высокодозном режиме облучения опухолей, что дает возможность увеличения дозы за одну фракцию, уменьшения их числа и таким образом сокращения времени и стоимости лечения. Существуют также экспериментальные данные, что такой режим облучения минимизирует ускоренную репопуляцию опухолевых клеток, подавляет способность опухолевых клеток к метастазированию и позволяет более эффективно повреждать радиорезистентные стволовые клетки опухоли [13–15]. Развитие олигофракционирования, когда облу-

чение происходит за один–три сеанса при очень высокой дозе (25–30 Гр) за фракцию, также рассматривается как способ лечения устойчивых форм рака головы и шеи.

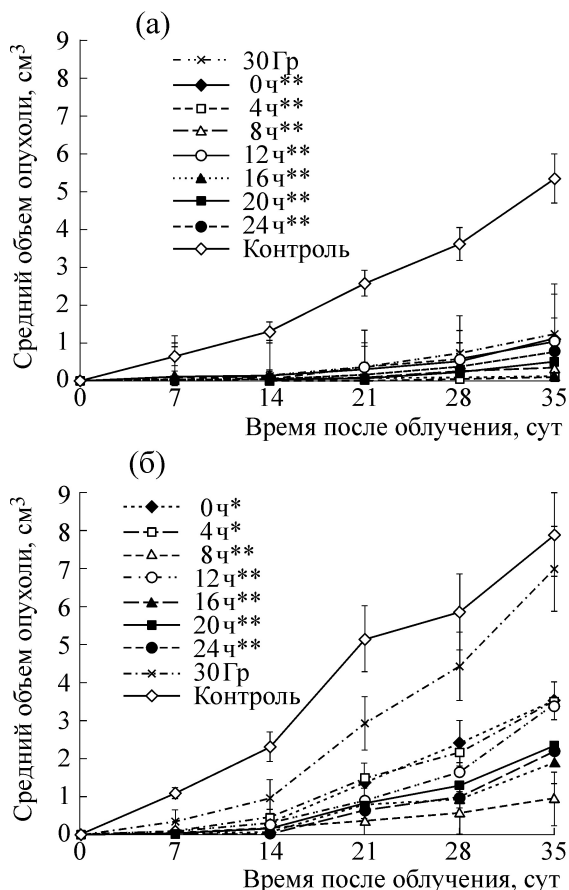
Для широкого исследования разных схем протонной радиотерапии существует проблема недостатка удобных экспериментальных моделей, позволяющих отрабатывать разные условия облучения (суммарная доза облучения, доза одной фракции, интервал между фракциями, объем облучаемой ткани), а затем оценить по многим параметрам эффективность лечения. В настоящее время практически не существует систематических экспериментальных данных при облучении животных с опухолями *in vivo* высокоэнергетическими протонами в зависимости от разных условий, т.е. нет стандартной экспериментальной модели, поскольку основные работы выполнены на культурах опухолевых клеток.

Целью нашей работы являлось изучение динамики роста солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей в зависимости от объема облучения и времени между фракциями при гипофракционированном высокодозном режиме облучения тонким сканирующим пучком протонов и возможности использования этой опухоли в качестве адекватной модели для протонной терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на самцах мышей колонии SHK массой 24–28 г, которых содержали в стандартных условиях вивария. В каждой группе было по 10–30 животных. Эксперименты проводили согласно нормативно-правовым актам о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному отношению к ним [16].

Моделью опухоли служила солидная форма асцитной карциномы Эрлиха, перевиваемая внутримышечно в бедро левой задней лапы в количестве 2 млн клеток. Динамику роста асцитной карциномы Эрлиха регистрировали по объему опухоли еженедельно в течение месяца. На пятый день после перевивки, когда опухолевый узел сформировался у всех мышей, животных наркотизировали смесью «ксилазин + золетил», фиксировали на платформе таким образом, чтобы облучаемая конечность была максимально удалена от тела, затем платформу наклонно погружали в камеру с теплой водой (водный фантом). Далее осуществляли контрольное облучение водного фантома с установленными в нем дозиметрами и готовили план облучения мышей. Облучение проводили



Динамика роста асцитной карциномы Эрлиха у мышей при разных временных интервалах между фракциями при облучении тонким сканирующим пучком протонов GTV-объема (а) и PTV-объема (б) ткани; ** $p \leq 0,01$ и * $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

на протонном синхротроне (Комплекс протонной терапии «Прометеус», ФТЦ ФИАН, Протвино Московской области) тонким пучком протонов с двух встречных направлений методом сканирования по заданному объему ткани в пике Брэгга с энергией протонов на выходе ускорителя 85–100 МэВ, сигма пучка составляла 2,8–3,6 мм. Режим облучения был импульсный с длительностью 200 мс и циклом 2 с. Контроль дозы осуществляли клиническим дозиметром на основе алмазного детектора (ИФТП, Россия) и дозиметрической пленкой (Gafchromic radiotherapy film EBT2, США). Мышей облучали по модели высокодозного гипофракционирования двумя фракциями по 30 Гр с интервалами между ними от 4 до 24 ч.

Согласно рекомендациям Международной Комиссии радиационных единиц установлены пять основных объемов в пациенте, в которых проводится расчет и регистрация доз: опреде-

ляемый объем опухоли (Gross Tumor Volume – GTV), клинический объем опухоли (Clinical Target Volume – CTV), планируемый объем облучения (Planning Target Volume – PTV), терапевтический объем (Treated Volume – TV), облученный объем (Irradiated Volume – IV). В нашем исследовании по трехмерной томограмме опухоли мышей с помощью специально разработанной планирующей системы был задан определяемый объем опухоли GTV, равный среднему размеру 0,47 см³, а другой группе животных область облучения ткани была увеличена до планируемого объема мишени PTV, равного 1,5 см³ [17]. Для оценки статистической значимости различий между группами использовали t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке представлена динамика роста асцитной карциномы Эрлиха у мышей при разных временных интервалах между фракциями (0, 4, 8 и 24 ч) при облучении тонким сканирующим пучком протонов GTV- и PTV-объемов ткани. Видно, что при всех временных вариантах фракционированного облучения скорость роста опухолей была существенно ниже относительно контрольной группы и не отличалась от таковой при однократном облучении в дозе 60 Гр как для GTV-, так и PTV-объемов облучения. Полученные результаты трудно интерпретировать с точки зрения влияния временных параметров между фракциями на те или иные молекулярные процессы, происходящие в клетках. В ряде работ показано, что индукция активных форм кислорода и клеточной гибели повышены при действии протонов в культивируемых опухолевых клетках, однако эти процессы зависят от энергии протонов, дозы, видов клеток и времени после облучения. Так, в работе [9] при облучении трех опухолевых клеточных линий (LLC, HepG2, Molt-4) низкоинтенсивным пучком протонов (35 МэВ) в широком пике Брэгга *in vitro* была обнаружена фрагментированная ДНК в HepG2, что приводило к увеличению количества апоптотических ДНК-фрагментов в клетках. Облученные протонами опухолевые клетки индуцировали также расщепление поли(АДФ-рибоза)-полимеразы-1 и прокаспаз-3 и 9. Показаны также разные профили экспрессии генов в нормальных и опухолевых тканях при действии редко- и высокоиницирующего излучений [18]. Несмотря на то, что интенсивно проводятся радиационные исследования, молекулярная токсикология и клеточные механизмы, вызываемые протонным излучением, остаются малоизученными.

Количество мышей без опухолей в разные сроки после облучения однократным и фракционированным протонным излучением GTV- и PTV-объемов ткани

Доза облучения	Количество мышей без опухолей, %									
	7 сут		14 сут		21 сут		28 сут		35 сут	
	GTV	PTV	GTV	PTV	GTV	PTV	GTV	PTV	GTV	PTV
30 Гр	100	100	80	40	50	40	0	0	0	0
60 Гр	100	100	80	90	80	40	80	30	60	30
30 + 30 Гр	99	98	93	82	88	52	81	45	78	37

Было показано, что высокоэнергетические протоны индуцируют клеточную гибель через активацию апоптотических сигнальных генов – каспазу-3 и 8 [19]. Авторы исследовали влияние различных доз протонов на ткань мозга мышей *in vivo*. Была обнаружена значительная дозозависимая индукция активных форм кислорода и окисления липидов, а также снижение уровня антиоксидантов – глутатиона и супероксиддисмутазы – по сравнению с мозгом контрольных мышей. Дальнейшие гистологические исследования на мозге мышей, облученных протонами, выявили значительное повреждение ткани. Таким образом, результаты, полученные *in vitro* и *in vivo*, подтверждают, что облучение протонами изменяет окислительно-восстановительный гомеостаз в клетках.

В настоящее время в связи с неопределенностью сведений об относительной биологической эффективности для протонов и их низкой токсичностью схемы протонной радиотерапии опухолей в клиниках мало отличаются от традиционной радиотерапии с суммарной дозой облучения (40–60 Гр за четыре–восемь недель). Однако особенности действия протонов с точной локализацией передачи энергии без повреждения окружающей ткани позволяют увеличить дозу фракции в несколько раз. Необходимость применения таких больших радиационных нагрузок для лечения больных с опухолями головы и шеи, устойчивыми к облучению, и особенно больных с плоскоклеточным раком, требует поиска нетрадиционных режимов фракционирования дозы и адекватных экспериментальных моделей опухолей. Данных, полученных на животных с опухолями, облученными экстремально высокими дозами протонов, пока нет. Полученные в нашем исследовании результаты по отсутствию различий при однократном облучении в суммарной дозе 60 Гр или 2 фракциями по 30 Гр через разные промежутки времени внушают оптимизм для дальнейшего развития этого метода.

При облучении сверхвысокими дозами протонов за счет точной локализации выброса

энергии в опухоли мы не наблюдали лучевых реакций кожи, фиксируемых по классификации RTOG/EORTC-95, влияния на желудочно-кишечный тракт или других лучевых последствий [20], что говорит о преимуществе этого типа излучения для здоровых, окружающих опухоль тканей. Увеличение области облучения ткани до планируемого объема мишени с захватом дополнительного объема здоровых тканей, который обычно используется при радиотерапии, в нашем исследовании оказалось менее эффективным, чем облучение точного объема опухоли. Эти результаты открывают дополнительные перспективы снижения побочных лучевых воздействий на окружающие ткани.

Поскольку кривые роста опухолей не отражают количество животных, у которых исчезли опухолевые узлы после облучения, необходимо было сравнить количество мышей без опухолей в разные сроки после облучения (таблица). Через 14 суток после облучения во всех группах начинают появляться мыши с опухолями. В группе, облученной в дозе 30 Гр одной фракцией, к 28 суткам уже не было мышей без опухолей независимо от объема облучения. В то же время в вариантах облучения GTV-объема в однократной дозе 60 Гр без опухолей было 80% мышей, а при облучении дозами 30 + 30 Гр – 81%. При анализе этого показателя оказалось, что облучение GTV-объема опухоли по сравнению с PTV было почти в два раза более эффективным, начиная уже с 21 суток после облучения как однократно, так и двумя фракциями. При сравнении фракционированного с однократным облучением в дозе 60 Гр этот показатель к 35 суткам достоверно лучше в группе, облученной двумя фракциями GTV-объема.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных экспериментов выявлено, что: 1) более высокая противоопухолевая эффективность наблюдалась при облучении асцитной карциномы Эрлиха у мышей

GTV-объема опухоли по сравнению с PTV-объемом мишени тонким сканирующим пучком протонов двумя фракциями по 30 Гр; 2) временные интервалы между фракциями не влияли на противоопухолевую эффективность облучения; 3) солидная форма перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха на мышах может быть использована в качестве удобной модели для отработки режимов гипофракционированного облучения животных. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего совершенствования методов адронной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- И. А. Гулидов, Радиационная онкология и ядерная медицина **1** (34), 34 (2013).
- В. В. Глебовская и А. В. Петровский, Радиационная онкология и ядерная медицина **1** (20), 20 (2014).
- Е. В. Хмелевский, Радиационная онкология и ядерная медицина **1** (28), 28 (2013).
- H. Suit, Th. DeLaney, S. Goldberg, et al., *Radiotherapy and Oncology* **95** (1), 3 (2010), <http://www.sciencedirect.com/science/journal/01678140/95/1>.
- T. Ogata, T. Teshima, K. Kagawa, et al., *Cancer Res.* **65** (1), 113 (2005).
- S. Auer, V. Hable, Ch. Greubel, et al., *Radiat. Oncology* **6** (1), 139 (2011).
- O. Zlobinskaya, S. Girst, C. Greubel, et al., *Radiat. Environ. Biophys.* **52** (1), 123 (2013).
- S. Girst, C. Greube, J. Reind, et al., *Radiat. Environ. Biophys.* **54** (3), 335 (2015).
- K. B. Lee, J. Lee, J. Park, et al., *Exp. Mol. Med.* **40** (1), 118 (2008).
- D. R. Olsen, O. S. Bruland, G. Frykholm, and I. N. Norderhaug, *Radiotherapy and Oncology* **83**, 123 (2007).
- R. Miralbell, S. Roberts, E. Zubizarreta, and J. Hendry, *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.* **82** (1), 17 (2012).
- С. А. Костромин и Е. М. Сыресин, *Письма в ЭЧАЯ* **11** (1), 183 (2014).
- Г. А. Раскин, Р. В. Орлова, А. Э. Протасова и др., *Вопр. онкологии* **59** (6), 694 (2013).
- C. I. Tang, D. A. Loblaw, P. Cheung, et al., *Clin. Oncology* **20**, 729 (2008).
- D. C. Weber, C. Ares, F. Albertini, et al., *Pediatr. Blood Cancer* (2015), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.25864/epdf>.
- Директива 2010/63/еи Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях (RUS-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными», рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы, СПб, 2012).*
- ICRU Report 62: Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy (International Commission on Radiation Units and Measurements, Bethesda, 1999).*
- M. Durante, *Brit. J. Radiol.* **87**, 20130626 (2014).
- S. Baluchamy, P. Ravichandran, V. Ramesh, et al., *Mol. Cell. Biochem.* **360** (1–2), 189 (2012).
- М. В. Филимонова, С. Е. Ульяненко, Л. И. Шевченко и др., *Радиац. биология. Радиоэкология* **55** (3), 260 (2015).

Hypofractionated Proton Therapy by Pencil Beam Scanning for Solid Form of Ehrlich's Carcinoma on Mice

V.E. Balakin*, A.E. Shemyakov*, S.I. Zaichkina**, O.M. Rozanova**, H.N. Smirnova**, S.P. Romanchenko**, S.S. Sorokina**, and N.S. Strelnikova*

*Physical Technical Center, Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Akademicheskii pr. 2/110, Protvino, Moscow Region, 142280 Russia

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The dynamics of the growth of the Ehrlich ascites carcinoma in SHK mice exposed to hypofractionated high-dose radiation with pencil scanning proton beam depending on irradiation volume and the time between 30-Gy dose fractions from 4 to 24 h has been studied. The irradiation of the gross tumor volume and planned target volume was carried out at the Bragg peak with proton energy at the accelerator output of 85–100 MeV. It was shown that the antitumor efficacy of the hypofractionated radiation of gross tumor volume of the Ehrlich ascites carcinoma is higher than that of the planned target volume. The effect observed did not depend on the interval between dose fractions.

Key words: hypofractionation, pencil beam scanning proton therapy, Ehrlich carcinoma, mice