

## ОТДАЛЕННЫЕ ЛУЧЕВЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ПОСЛЕ ГИПОФРАКЦИОНИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЯ ПРОТОНАМИ СОЛИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ

© 2017 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 пр., 2/110

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

E-mail: [szaichkina@yandex.ru](mailto:szaichkina@yandex.ru)

Поступила в редакцию 29.08.16 г.

Изучены отдаленные последствия (продолжительность ремиссии, частота рецидивов, средняя продолжительность жизни) у мышей-опухоленосителей асцитной карциномы Эрлиха, подвергнутых олигофракционированному облучению узким сканирующим пучком протонов в зависимости от объема облучаемой ткани и времени между фракциями. Полученные результаты продемонстрировали более высокую противоопухолевую эффективность и значительное увеличение средней продолжительности жизни после гипофракционированного облучения тонким сканирующим пучком протонов в суммарной дозе 60 Гр при захвате определяемого объема опухоли по сравнению с планируемым объемом мишени.

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

Протонная терапия (ПТ) опухолей в настоящий момент активно развивается и рассматривается в качестве альтернативы стандартной лучевой терапии с использованием фотонных излучений. Из-за высокой стоимости ПТ число таких пациентов невелико по сравнению с числом больных, вылеченных с помощью фотонной терапии, но накопленный клинический материал дает достаточное основание для широкого исследования и применения протонных пучков. Это позволит вывести ПТ из статуса исследовательского метода, для чего необходимы усилия в тех областях, в которых можно достигнуть максимально быстрых результатов и тем самым повысить качество жизни больных и снизить частоту рецидивов [1,2]. Особенности 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 мень-

шей степени зависимость от клеточного цикла. Наряду с этим уникальным преимуществом физического действия протонов являются параметры их дозового распределения: относительно низкая доза на входе и наличие пика Брэгга – максимального энерговыделения в конце пробега частицы на заранее заданной глубине, непосредственно в опухоли, что позволяет не повреждать окружающие здоровые ткани и органы, снижая вероятность побочных лучевых реакций. Несмотря на то, что протоны в отличие от других адронов обладают достаточно низкой относительной биологической эффективностью, которая составляет в пике Брэгга в среднем 0,9–1,6 в зависимости от линейной потери энергии, уровня дозы, чувствительности объекта и используемого теста, важна возможность высокоточного облучения опухоли. Все вместе это обеспечивает большую эффективность ПТ. В последнее время используется наиболее перспективный вид протонной терапии – тонкий сканирующий пучок (pencil beam scanning), так называемая PBS-технология, которая повышает коэффициент полезного действия пучка, обеспечивает гомогенность дозы в мишени, снижает вклад в дозу вторичных частиц и лучевую на-

Сокращения: ПТ – протонная терапия, ОСК – опухолевые стволовые клетки, АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха, GTV – определяемый объем опухоли, PTV – планируемый объем мишени, СПЖ – средняя продолжительность жизни.

грузку на кожу. Использование активных сканирующих протонных пучков позволяет на порядок снизить интегральную лучевую нагрузку на тело пациента, что напрямую связано с уменьшением риска развития вторичных опухолей [1]. Таким образом, становится понятным, что для дальнейшего совершенствования ПТ необходима апробация режимов гипофракционирования и даже олигофракционирования (1–3 фракции) облучения, которые за счет сокращения количества фракций и увеличения разовой дозы позволяют сократить время лечения и повысить его эффективность.

В нескольких работах показано, что при протонном облучении значительно снижается коэффициент кислородного усиления в ткани, минимизируется ускоренная репопуляция опухолевых клеток, подавляется их способность к метастазированию, а также более эффективно повреждаются радиорезистентные стволовые клетки опухоли, которые являются причиной возникновения вторичных опухолей [3,4]. В настоящее время кардинально изменилось представление о механизмах возникновения, роста, взаимодействия структурных компонентов опухоли, метастазирования и рецидивирования в связи с тем, что ведущим компонентом ее считают достаточно небольшой пул (обычно не более 1–4%) опухолевых стволовых клеток (ОСК), которые обладают свойствами стволовых клеток: способностью к самообновлению, дифференцировке, относительной резистентностью по сравнению с дифференцированными формами и способностью к метастазированию [5,6]. В литературе появились данные о таких радиобиологических характеристиках ОСК как радиочувствительность клеток, характер кривых «доза–эффект», способность к репарации сублетальных и потенциально летальных повреждений, эффекты радиомодификаторов, зависимость от величины линейной передачи энергии. На основании экспериментов на культурах клеток сложилось общее представление, что ОСК более резистентны к действию редкоионизирующего излучения и ряда химиопрепаратов по сравнению с остальными клетками опухоли и их нормальными аналогами из пулов стволовых клеток взрослого организма. Однако обнаружены существенные различия в ответе опухолевых стволовых и не стволовых клеток: количество ОСК увеличивалось после однократного облучения в диапазоне доз 1–10 Гр в культурах разных линий, в то время как не стволовые клетки опухоли гибли с ростом дозы. При фракционированном облучении *in vivo* в суммарной очаговой дозе 10 Гр относительное число ОСК возрастало у всех больных раком

верхних дыхательных путей. Эти данные демонстрируют гетерогенность ответов клеточных популяций опухоли при радиотерапии [7]. Исследования молекулярных механизмов действия плотноионизирующих излучений в основном выполнены на отдельных культурах нормальных или опухолевых клеток, в частности, при действии протонов показана усиленная по сравнению с рентгеновским излучением индукция активных форм кислорода и активация каспаз, что приводит к эффективной гибели опухолевых клеток [8]. Данных об эффектах плотноионизирующих излучений на ОСК совсем немного. Показано, что при действии протонов с энергией 3 МэВ эквивалентные дозы по сравнению с гамма-радиацией более эффективно уменьшали популяцию ОСК-подобных клеток карциномы печени, при этом в 10 раз отличалась экспрессия генов, ответственных за клеточную гибель [9]. Такие результаты дают основание для более активного поиска новых путей в адронной терапии для преодоления радиорезистентности опухолей и снижения частоты рецидивирования, из которых одним из перспективных, на наш взгляд, является гипофракционированное высокодозное облучение протонами. К настоящему моменту стало понятно, что эксперименты на отдельных линиях клеток не позволяют учитывать сложную многокомпонентную структуру опухоли, состоящую из клеток, обладающих разной радиочувствительностью или даже разнонаправленными ответами на одни и те же дозы при лучевой терапии. В связи с этим для разработки новых схем фракционирования при ПТ необходимы адекватные экспериментальные модели опухолей на животных, позволяющие оценить не только эффективность лечения по многим параметрам, но и дающие возможность наблюдения за рецидивами и развитием отдаленных лучевых реакций.

В предыдущей работе при облучении солидной карциномы Эрлиха у мышей тонким сканирующим пучком протонов двумя фракциями по 30 Гр нами было показано, что временные интервалы между фракциями не влияли на противоопухолевую эффективность облучения. Более высокая противоопухолевая эффективность наблюдалась при облучении определяемого объема опухоли по сравнению с облучением планируемого объема мишени, что дало основание считать, что модель солидной карциномы Эрлиха на мышах может быть использована для исследования контроля роста опухоли при различных режимах гипофракционированного облучения протонами [10]. В связи с ограниченностью числа установок для ПТ и

сложностью проведения экспериментов в настоящее время нет систематических исследований отдаленных последствий ПТ на животных. В современной онкологической практике к наиболее важным показателям результативности лучевой терапии относятся продолжительность безрецидивного периода, частота рецидивов и продолжительность жизни пациентов. В связи с этим целью настоящей работы являлось исследование отдаленных последствий (продолжительность ремиссии, частота рецидивов асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), средняя продолжительность жизни после ПТ) у мышей-опухоленосителей, подвергнутых олигофракционированному облучению узким сканирующим пучком протонов в зависимости от объема облучаемой ткани и времени между фракциями.

## 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 [11]. Для индукции солидной формы АКЭ мышам вводили суспензию в концентрации 2 млн клеток внутримышечно в бедро левой задней лапы. На пятый день после инокуляции, когда опухолевый узел сформировался у всех мышей, животных наркотизировали смесью ксилазина и золетила и фиксировали на специальной 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 него дозиметрами и готовили план облучения мышей. Облучение проводили 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 олигофракционирования двумя фракциями по

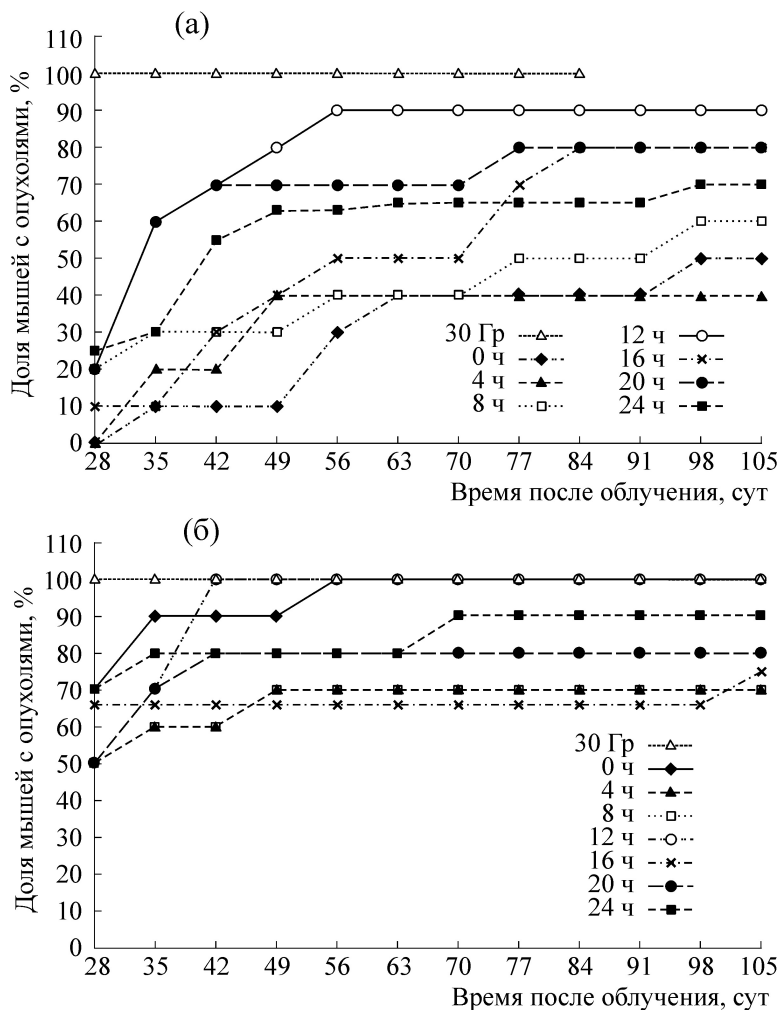
30 Гр с интервалами между ними от 4 до 24 ч. Для определения объема облучаемой ткани получали томограмму мышцы в водном фантоме и с помощью специально разработанной трехмерной планирующей системы задавали определяемый объем опухоли (GTV – Gross Tumor Volume), равный среднему размеру 0,47 см<sup>3</sup>, а другой группе животных область облучения ткани была увеличена до планируемого объема мишени (PTV – Planning Target Volume), равного 1,5 см<sup>3</sup>, согласно установленным рекомендациям Международной комиссии радиационных единиц [12]. Если GTV-объем представляет собой пальпируемый, инструментально измеренный объем опухоли, то PTV-объем включает клинический объем с дополнительным отступом, что связано с возможным изменением положения мишени при дыхании, погрешностей при укладке пациента, учетом всех возможных геометрических неточностей, выбором подходящих размеров и конфигураций опухоли и особенностями оборудования.

После облучения регистрировали показатели противоопухолевой эффективности, характеризующие отдаленные лучевые последствия – дату появления вторичных опухолей (время ремиссии), число мышей с рецидивами АКЭ; среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышей с опухолями и без них. СПЖ была выбрана как общий показатель состояния животных, поскольку в ходе этого исследования не удалось выявить достоверно значимого вклада в выживаемость от лучевых реакций кожи, фиксируемых по классификации RTOG/EORTC-95 [13]. Во всех облученных протонами группах мы не наблюдали выраженного проявления кожных лучевых реакций, которые характерны при аналогичных дозах рентгеновского излучения, но у отдельных животных наблюдали умеренную эритему, эпиляцию и сухой эпидермит, которые со временем исчезали без какого-либо лечения. Животных в терминальном состоянии подвергали эвтаназии, считая этот день датой гибели.

Для статистического анализа использовали непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни. Во всех случаях применялись двусторонние альтернативные гипотезы. *U*-критерий Манна–Уитни был выбран потому, что он не требует наличия нормального распределения сравниваемых совокупностей и равенства их дисперсий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущей работе при анализе в течение месяца динамики роста АКЭ и количества животных, у которых исчезли опухолевые узлы, нами была показана более высокая противо-



**Рис. 1.** Динамика появления рецидивов АКЭ после фракционированного облучения мышей тонким сканирующим пучком протонов GTV- (а) и PTV-объемов ткани (б) в суммарной дозе 60 Гр в зависимости от времени между фракциями.

опухолевая эффективность при облучении АКЭ у мышей GTV-объема опухоли по сравнению с PTV-объемом мишени тонким сканирующим пучком протонов двумя фракциями по 30 Гр; при этом временные интервалы между фракциями не влияли на контроль роста опухоли. В данной работе мы наблюдали за отдаленными лучевыми последствиями у мышей с полной регрессией опухолевых узлов через месяц после ПТ, т.е. у «вылеченных» животных. К моменту начала наблюдений в группе при облучении GTV-ткани не было опухоли у 81% животных (60 мышей), а при облучении PTV-ткани – у 45% животных (33 мыши) [10]. На рис. 1 показана динамика появления рецидивов АКЭ после фракционированного облучения мышей тонким сканирующим пучком протонов GTV- и PTV-объемов ткани в суммарной дозе 60 Гр в зависимости от времени между фракциями. Оказалось, что независимо от облученного объ-

ема ткани и времени между фракциями во всех вариантах после фракционированного или однократного облучения в дозе 60 Гр появление рецидивов АКЭ в том же месте у мышей наблюдалось в течение месяца после полного исчезновения первичной опухоли. При сравнении частоты рецидивов при облучении GTV- и PTV-объемов этот показатель также не отличался – 60 и 57,5% от количества условно вылеченных мышей к одному месяцу после облучения (таблица). При дальнейшем наблюдении за мышами с рецидивами АКЭ и без опухолей определяли их СПЖ. Поскольку для обоих вариантов, различающихся объемом облучения, достоверных различий в группах, облученных двумя фракциями через разные временные интервалы, не было выявлено, то в дальнейшем мы суммировали результаты. На рис. 2 представлена динамика гибели мышей после ПТ, где видно, что выживаемость выше в группе с облучением

Частота рецидивов и СПЖ мышей после облучения тонким сканирующим пучком протонов в суммарной дозе 60 Гр в зависимости от облучаемого объема ткани

Условия облучения (число мышей)	GTV			PTV		
	Начало роста рецидивной опухоли после ПТ, сут	СПЖ, сут (число мышей)		Начало роста рецидивной опухоли после ПТ, сут	СПЖ, сут (число мышей)	
		с рецидивами	без опухолей		с рецидивами	без опухолей
30 Гр (n = 10)	0	–	35 (n = 1)	–	–	–
60 Гр (n = 10)	35	111 (n = 6)	242 (n = 4)	42	80 (n = 3)	–
30 Гр×2 через 4 ч (n = 10)	49	76 (n = 2)	243 (n = 6)	35	77 (n = 2)	325 (n = 3)
30 Гр×2 через 8 ч (n = 10)	35	103 (n = 4)	334 (n = 4)	42	74 (n = 3)	186 (n = 4)
30 Гр×2 через 12 ч (n = 10)	35	73 (n = 5)	546 (n = 1)	35	64 (n = 5)	–
30 Гр×2 через 16 ч (n = 10)	42	95 (n = 7)	438 (n = 2)	97	129 (n = 1)	261 (n = 3)
30 Гр×2 через 20 ч (n = 10)	35	80 (n = 3)	356 (n = 2)	35	82 (n = 3)	205 (n = 2)
30 Гр×2 через 24 ч (n = 20)	35	106 (n = 9)	236 (n = 5)	35	74 (n = 2)	140 (n = 2)
Среднее	38	95,94 ± 11,61 (n = 36)	283,04 ± 68,04 (n = 25)	46	76,79 ± 8,19 (n = 19)	228 ± 55,71 (n = 14)

GTV-объема, максимальная продолжительность жизни мышей без рецидивов в этой группе увеличивается на пять месяцев, а с рецидивами – на три месяца. Как видно из таблицы, СПЖ мышей с рецидивами АКЭ в группе с облучением GTV-объема была выше, чем в группе с облучением PTV-объема, и составляла 96 или 58 сут, а для PTV-объема – 77 или 31 сут с момента облучения или после появления рецидива соответственно ( $p \leq 0,01$ ). Скорость роста вторичных АКЭ в группе облучения PTV-объема не отличалась от скорости роста первичной опухоли у облученных мышей, СПЖ которых составляла 35 сут, однако в группе GTV-объема наблюдали значительное торможение роста рецидивной опухоли. СПЖ мышей без опухолей была также значительно выше в группе с облучением GTV-объема – 283 сут, по сравнению со 228 сут при облучении PTV-объема ( $p \leq 0,01$ ). Известно, что модель солидной формы асцитной карциномы Эрлиха пред-

ставляет собой быстрорастущую, агрессивную, достаточно радиоустойчивую опухоль при 100% гибели животных в течение месяца при инокуляции 1–2 млн клеток. Продолжительность жизни мышей с рецидивами АКЭ в группе PTV-объема была такой же, как и с первичными опухолями, такое экстремальное рецидивирование свидетельствует о том, что не только сохранение небольшого количества наиболее радиоустойчивых опухолевых клеток, но и повреждение большего объема окружающих тканей играет роль в индукции роста вторичной опухоли.

Таким образом, облучение тонким сканирующим пучком протонов PTV-объема с захватом не только реального размера опухоли, но и окружающей ткани, и GTV-объема мишени не влияло на частоту рецидивов АКЭ и время ремиссии, что, вероятно, свидетельствует о неполной гибели опухолевых клеток или ОСК, однако при одинаковой частоте рецидивирова-

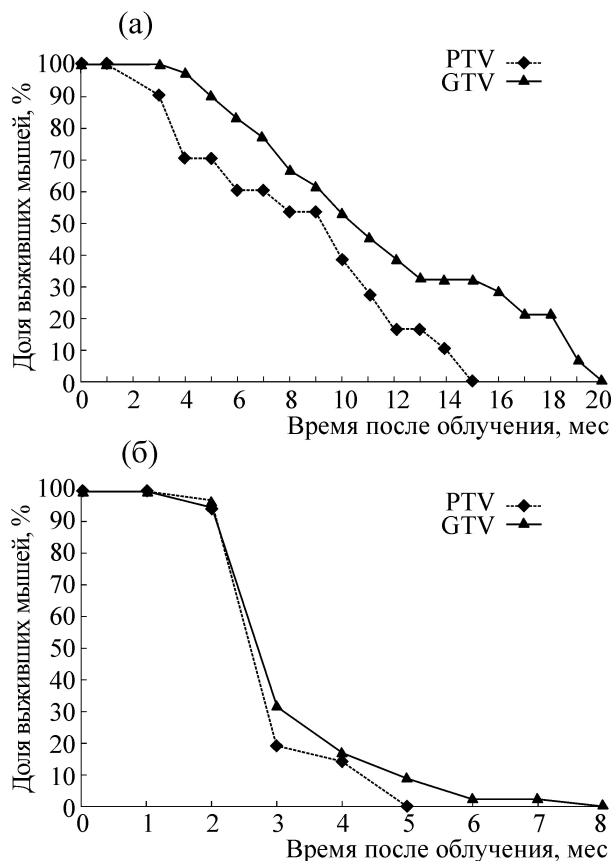


Рис. 2. Динамика гибели безрецидивных (а) и рецидивных мышей-опухоленосителей (б) при облучении протонами разных объемов ткани.  $p \leq 0.05$ .

ния в обеих группах в вариантах с облучением GTV-объема существенно увеличивалась СПЖ мышей без опухолей. Эти результаты говорят о том, что облучение меньшего объема ткани благоприятно для прогноза СПЖ «вылеченных» мышей. Полученные данные демонстрируют, что при данной локализации и размерах солидной АКЭ нет необходимости увеличивать объем облучаемой ткани для повышения результативности лечения. Обращает на себя внимание, что при однократном и фракционированном облучении GTV-объема опухоли в дозе 60 Гр получены близкие эффекты, что открывает перспективу увеличения разовой очаговой дозы. Однако при облучении PTV-объема однократно в дозе 60 Гр наряду с низкой эффективностью роста первичной опухоли наблюдались низкие показатели и по частоте рецидивирования, что может свидетельствовать о влиянии токсического действия высоких доз радиации на окружающие ткани, превалирующие над контролем роста опухоли. Аналогичных исследований эффективности высокодозовой протонной терапии с достаточно длительными сроками наблюдения на экспериментальных моделях

животных нами не обнаружены. В немногочисленных клинических работах по отдаленным последствиям после ПТ на пациентах с разными видами раков обычно используются рутинные схемы фракционированного облучения с увеличением разовой дозы с учетом относительной биологической эффективности протонов [3,14]. В наиболее законченном цикле работ на мышах *in vivo* после облучения их ускоренными ионами углерода в расширенном пике Брэгга в единичной дозе 43,9 Гр были исследованы контроль роста имплантированной в бедро СЗН/Tif карциномы молочной железы мыши, частота и тяжесть острых кожных реакций (наблюдение в течение 40 дней) и частота радиационных фиброзов (наблюдение до 322 дней). По этим критериям была определена относительная биологическая эффективность для ускоренных ионов углерода, составившая 1,36–1,50. Авторы подчеркивают необходимость систематических исследований на релевантных моделях разных видов опухолевых и нормальных тканей; обсуждается выбор критериев для определения биологической эффективности адронами в отдаленные сроки после терапии [15].

В результате проведенных экспериментов показано, что модель солидной карциномы Эрлиха на мышах может быть использована не только для исследования контроля роста опухоли при различных режимах гипофракционированного облучения протонами, но и для наблюдения за рецидивами опухоли и других отдаленных последствий радиотерапии. Полученные результаты продемонстрировали более высокую противоопухолевую эффективность и значительное увеличение средней продолжительности жизни после гипофракционированного облучения тонким сканирующим пучком протонов в суммарной дозе 60 Гр при захвате GTV-объема ткани по сравнению с PTV-объемами мишеней. Апробированная система позиционирования и трехмерного планирования облучения мышей и предложенные схемы гипофракционированного облучения продемонстрировали возможности нового протонного комплекса и могут быть использованы для дальнейшего развития ПТ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. А. Гулидов, Радиационная онкология и ядерная медицина, № 1, 34 (2013).
2. В. В. Глебовская и А. В. Петровский, Радиационная онкология и ядерная медицина, № 1, 20 (2014).
3. Е. В. Хмелевский, Радиационная онкология и ядерная медицина, № 1, 28 (2013)

4. С. А. Костромин и Е. М. Сыресин, Письма в ЭЧАЯ **11** (1), 183 (2014).
5. Г. А. Раскин, Р. В. Орлова, А. Э. Протасова и др., *Вопр. онкологии* **59** (6), 694 (2013).
6. D. C. Weber, C. Ares, F. Albertini, et al., *Pediatr. Blood Cancer* (2015), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.25864/epdf>.
7. И. А. Замулаева, О. Н. Матчук, Е. И. Селиванова и др., *Радиац. биология. Радиоэкология* **54** (3), 264 (2014).
8. R. A. Mitteer, et al., *Scientific Reports*, № 5, 13961.
9. H. Narang, A. Kumar, N. Bhat et al., *Mut. Res.* **780**, 46 (2015).
10. В.Е. Балакин, А.Е. Шемяков, С.И. Заичкина и др., *Биофизика* **61** (4), 812 (2016).
11. *Директива 2010/63/еи Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях* (СПб, 2012).
12. *ICRU Report 62: Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy* (International Commission on Radiation Units and Measurements, Bethesda, 1999).
13. М. В. Филимонова, С. Е. Ульяненко, Л. И. Шевченко и др., *Радиац. биология. Радиоэкология* **55** (3), 260 (2015).
14. S. Rieken, D. Habermehl, T. Haberer, et al., *Radiat. Oncology* **7** (41), 7 (2012).
15. B. S. Sorensen, M. R. Horsman, J. Alsner, et al., *Acta Oncologica* **54**, 1630 (2015).

## Remote Effects of Radiation After Hypofractionated Irradiation with Protons for Ehrlich Ascites Carcinoma in Mice

**V.E. Balakin\***, **A.E. Shemyakov\***, **S.I. Zaichkina\*\***, **O.M. Rozanova\*\***, **E.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 work was devoted to the study of remote effects (duration of remission, frequency of occurrence, mean lifespan) in mice with Ehrlich ascites carcinoma exposed to oligofractionated irradiation with a pencil scanning beam of protons depending on the volume of the tissue being irradiated and the interval between dose fractions. The results showed higher antitumor efficacy and a considerable increase in the mean life span of mice after hypofractionated irradiation with a pencil scanning beam of protons in a total dose of 60 Gy of a gross tumor volume as compared with the planned target volume.

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