

ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВЫ МЫШЕЙ ГАММА-КВАНТАМИ И ПРОТОНАМИ НА ПАРАМЕТРЫ ИХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ПОВЕДЕНИЕ

К.Ш. Восканян¹, А.В. Рзянина¹, Д.М. Борович^{1,2}, Г.В. Мицын¹,
В.Н. Гаевский¹, А.Г. Молоканов¹

¹ Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

² Великопольский центр рака, Познань, Польша

Проводились эксперименты по изучению действия фракционированного облучения головы мышей γ -квантами и протонами на параметры их периферической крови и поведение по тесту “открытое поле”. Мыши облучались ионизирующими излучениями в двух вариантах фракционированного облучения: 1) традиционное фракционирование (для лучевой терапии) – 2 Гр один раз в день, 5 раз в неделю, суммарная доза облучения 20 Гр; 2) “экстремальное” гипофракционирование – 10 Гр один раз в неделю, суммарная доза облучения 20 Гр. Результаты исследования показали, что облучение головы мышей в обоих использованных вариантах фракционирования не влияет на параметры их периферической крови, а поведение мышей не зависит от вида ионизирующего излучения и варианта использованного нами фракционированного облучения. На основании полученных в исследовании результатов можно заключить, что выбранный нами вариант “экстремального” гипофракционирования может успешно заменить традиционное фракционирование, которое в ряде случаев применяется при лучевой терапии опухолей головного мозга. Использование данного вида фракционирования может привести к укорачиванию срока проведения лечения, а также увеличить пропускную способность медицинских центров, проводящих лучевую терапию.

Ключевые слова: *лучевая терапия, протоны, гамма-излучение, головной мозг, мышцы, традиционное фракционирование, экстремальное гипофракционирование*

Введение

Использование ионизирующих излучений в лучевой терапии онкологических заболеваний основано на различиях в радиочувствительности опухоли и нормальных тканей. Хорошо известно, что при воздействии ионизирующих излучений на биологические объекты возникают альтернативные процессы – повреждение и восстановление клеток, при этом нормальные ткани за счет стойких нейрогуморальных связей с организмом-носителем восстанавливают лучевые повреждения быстрее и полнее, чем опухоль, в силу присущей ей автономии. Развитие лучевой терапии привело к

появлению ставших “традиционными” для разных стран режимов фракционирования дозы. Например, в соответствии с Манчестерской школой, курс радикального лучевого лечения состоит из 16 фракций и проводится более 3 недель, в то время как в США 35–40 фракций подводятся в течение 7–8 недель. В России в случаях радикального лечения традиционным считается фракционирование по 1,8–2 Гр один раз в день, 5 раз в неделю до суммарных доз, которые определяются морфологической структурой опухоли и толерантностью нормальных тканей, расположенных в зоне облучения (обычно в пределах 60–70 Гр) [1].

За последние несколько десятилетий были внесены значительные улучшения в лучевой терапии злокачественных опухолей головы и шеи. Постепенное введение метода модуляции интенсивности пучка излучения, использование мультимодальности изображений объема мишени и органов, попадающих в зону риска, а также использование альтернативных схем фракционирования и сопутствующая химиотерапия привели к повышению эффективности лучевой терапии [2]. В то же время, высокие темпы современной жизни, незаинтересованность пациентов в пролонгированном (и экономически более затратном) лучевом лечении заставляют искать альтернативные пути решения проблемы, один из которых – гипофракционирование [3]. Существует два подхода к гипофракционированию. Первым является “умеренное” гипофракционирование, что снижает общую продолжительность лечения до 4–5,5 нед, увеличивая размер фракции приблизительно от 2,4 до 3,1 Гр. Второй – “экстремальное” гипофракционирование, при котором фракции доходят до диапазона от 4,7 до 8,0 Гр, сокращая продолжительность лечения до уровня 2–2,5 нед [4].

Ранее, с целью получения информации о возможной репарации нормальной ткани после облучения γ -квантами, мы провели эксперименты для сравнения острого и фракционированного облучения клеток мышечных фибробластов C3H10T1/2 в условиях, максимально приближенных к клиническим условиям. Использовалось γ -излучение ^{60}Co в суммарной дозе от 4 до 20 Гр (величина одной фракции 2 Гр, временной интервал между фракциями – 24 ч, 5 дней в неделю) [5]. Оказалось, что с увеличением дозы облучения разница (по критерию выживаемости клеток) между фракционированным и острым облучением уменьшается, а при дозе 20 Гр – уже не наблюдается. Это означало, что с увеличением дозы облучения увеличивается величина необратимого компонента лучевого поражения клеток (увеличивается число нерепарабельных повреждений). На основании этих результатов, в данной работе было исследовано влияние фракционированного облучения (традиционного и гипофракционированного) головы мышей γ -квантами и протонами на параметры их периферической крови и на поведение по тесту “открытое поле”.

Методика

Опыты были проведены на аутбредных мышцах (самках) CD1 массой 25–31 г в соответствии с биоэтическими правилами проведения исследований на животных [6].

Животные получали стандартный брикетированный корм и питьевую воду из поилок. Перед забоем мышцей взвешивали, из хвоста животных брали кровь для подсчета количества лейкоцитов периферической крови, а также для определения содержания гемоглобина в крови, затем забивали методом цервикальной дислокации.

Для подсчета количества кариоцитов костного мозга из очищенной от мышц бедренной кости животного с помощью шприца извлекали костный мозг, который суспензировали в 4 мл 3 %-го раствора уксусной кислоты. Содержание гемоглобина в крови определяли с помощью гемоглобинометра Мини-Гем 540 (“Техномедика” НПП, ЗАО, Россия). Количество лейкоцитов крови и кариоцитов подсчитывали с помощью камеры Горяева по общепринятой методике [7].

Облучение

Облучение мышцей проводилось в Медико-техническом комплексе (МТК) Лаборатории ядерных проблем Объединенного института ядерных исследований, предназначенном для проведения адронной терапии онкологических заболеваний [8]. Выделенные из ускорителя фазотрона протоны с энергией 660 МэВ замедлялись в углеродных блоках. После коллимирования и магнитного анализа пучок протонов транспортировали в одну из комнат МТК, предназначенных для облучения пациентов. Средняя энергия протонного пучка на входе в кабину определенная полупроводниковым кремниевым детектором по пробегу пучка в воде ($R = 200$ мм воды) равнялась 171 МэВ. Облучение мышцей проводили с использованием дополнительного замедлителя толщиной 12 мм водного эквивалента воды. Энергия пучка в точке облучения составляла ≈ 150 МэВ.

Дозиметрическая калибровка пучка в каждой точке глубинного дозного распределения проводилась с помощью клинического дозиметра PTW UNIDOS-E (PTW- Freiburg, Германия) с ионизационной камерой ТМ30013. Глубинное и горизонтальное дозные распределения пучка показаны на рис. 1 и 2.

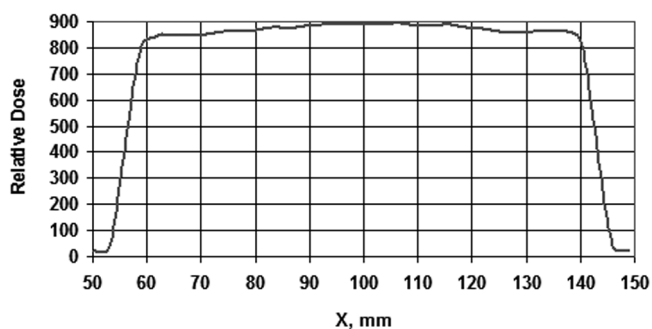


Рис. 1. Горизонтальный профиль протонного пучка

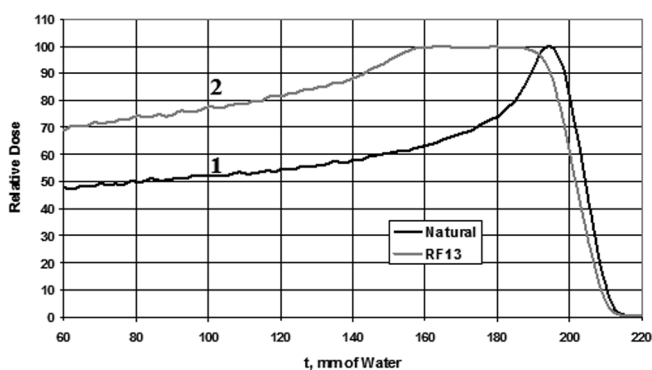


Рис. 2. Глубинное дозное распределение протонного пучка: натуральный пучок (1) и модифицированный (2) с использованием гребенчатого фильтра

Поперечные размеры пучка в точке облучения составляли 8×8 см по 90 %-изодозе (рис. 1). Для равномерного облучения мышей по глубине, энергетический спектр пучка преобразовывался специальным устройством – гребенчатым фильтром, в результате чего на глубинно-дозном распределении пучка формировался плоский максимум ионизации протяженностью около 50 мм (рис. 2).

Мышей облучали дозами протонов на плоской вершине модифицированного пика Брэгга (рис. 2). Значение ЛПЭ на входе пика Брэгга было равно $\sim 0,54$ кэВ/мкм, а на пике Брэгга $\sim 1,4$ кэВ/мкм (мощность дозы $\sim 0,5$ Гр/мин и ~ 1 Гр/мин соответственно).

Для облучения мышей γ -квантами использовали γ -терапевтический аппарат “Рокус-М” фирмы “Равенство” с источником ^{60}Co (ЛПЭ $\sim 0,3$ кэВ/мкм, мощность дозы $\sim 0,87$ Гр/мин).

Измерения мощности дозы гамма-излучения проводились дозиметром РТW

UNIDOS-E с ионизационной камерой ТМ30013-03378 при полностью открытом коллиматоре (размеры коллиматора 26×22 см).

При облучении мышей их по одной особи помещали в станки со специальными вытянутыми носиками для расположения головы. Для облучения γ -лучами станки располагались на одной линии, затем накрывались свинцовыми блоками с размерами 20 см (длина) \times 10 см (ширина) \times 5,5 см (толщина) (рис. 3). Необходимо подчеркнуть, что толщина 5,5 см соответствует стандартам защитных блоков, используемых в лучевой терапии, а доза 10 Гр является смертельной для мышей при облучении всего тела [9]. Для облучения мышей протонами станки располагались парами на двух параллельных уровнях, носиками друг к другу (рис. 4).

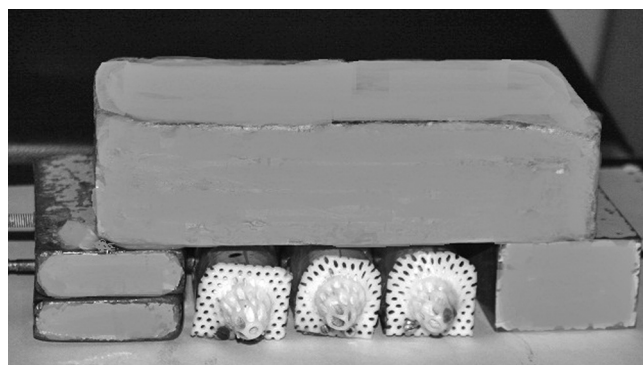


Рис. 3. Облучение головы мышей γ -квантами

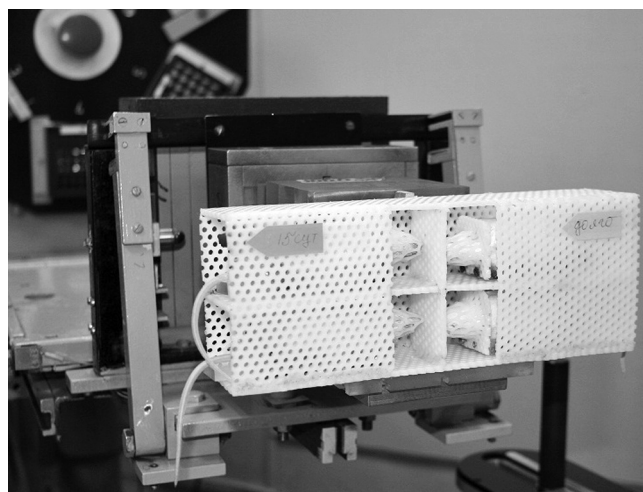


Рис. 4. Облучение головы мышей протонами

Мыши облучались ионизирующими излучениями в двух вариантах фракционированного облучения:

1. Традиционное фракционирование – 2 Гр один раз в день, 5 раз в нед, суммарная доза облучения 20 Гр.
2. “Экстремальное” гипофракционирование – 10 Гр один раз в неделю, по понедельникам, суммарная доза облучения 20 Гр.

Проведение теста “открытое поле”

Хорошо известно, что применение лучевой терапии, которая необходима в большинстве случаев при лечении опухолей мозга, может приводить к развитию отдаленных последствий в виде эндокринных нарушений, снижения интеллектуальных качеств и когнитивных возможностей, нарушению функционирования органов чувств [10].

Поведение мышей по тесту “открытое поле” [11] проверялось в разные сроки после последнего дня облучения. Тест заключается в количественном измерении компонентов поведения животного, помещенного в новое открытое пространство – арену (рис. 5). Обычно в тесте “открытое поле” регистрируют горизонтальную и вертикальную двигательную активность (ВГА), груминг, обнюхивание отверстий (норка), дефекацию и уринацию, замирание, выход в центр арены и другие факторы поведения мышей. После проведения теста, мышей забивали для определения параметров периферической крови и количества кариоцитов костного мозга. Исследование крови в гемато-

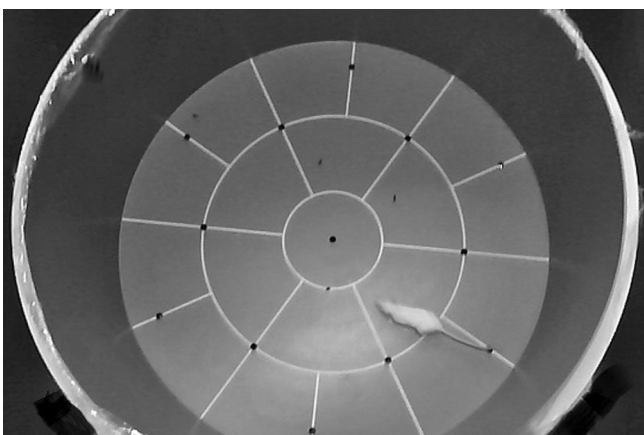


Рис. 5. Арена теста “открытое поле”

логических группах проводили на 7-е, 15-е и 30-е сут после облучения. Общий контрольный срок наблюдения составлял 30 сут.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены значения параметров периферической крови и кариоцитов костного мозга мышей облученных гамма-квантами при разных режимах фракционирования в суммарной дозе 20 Гр в разные сроки после облучения. Из таблицы видно, что параметры периферической крови облученных мышей достоверно не отличаются от параметров периферической крови интактных мышей при всех сроках после облучения и для обоих вариантов фракционирования. Такая же картина наблюдается в случае облучения мышей протонами (табл. 2). На основании этих результатов можно заключить, что облучение головы мышей в обоих использованных вариантах фракционирования не влияет на параметры их периферической крови.

Поведение мышей по тесту “открытое поле” через 30 сут после облучения γ -квантами в суммарной дозе 20 Гр представлено в табл. 3. При проведении этого теста мы наблюдали очевидное различие в поведении облученных и интактных мышей. У интактных мышей не наблюдалась тревожность после помещения в новое открытое пространство (арену) установки, об этом свидетельствовали высокая (особенно в первые минуты) горизонтальная и вертикальная активность, частое заглядывание в норки и посещение центральной части арены, отсутствие замирания и уринации, а также редкие эпизоды груминга. В группах облученных мышей (табл. 3) уменьшилось число выходов в центр, снизилось количество случаев поиска норки, а также горизонтальная и вертикальная активность. При этом возросли числа актов замирания и груминга. Все это указывало на увеличение тревожности облученных животных, их эмоциональную напряженность и снижение исследовательских способностей.

Существование различий в поведении мышей через 30 сут после облучения γ -квантами послужило основанием для исследования поведения мышей в более ранние сроки после воздействия протонами. Оказалось (табл. 4), что разница в поведении интактных и облученных мышей проявляется уже на 15 сут после облучения протонами и по количественным па-

Таблица 1

Значения параметров периферической крови и кариоцитов костного мозга интактных мышей, а также мышей, облученных γ -квантами в суммарной дозе 20 Гр

Количество мышей	Средняя масса тела, г	Гемоглобин, г/л	Лейкоциты, 10^3 мкл	Кариоциты, 10^3 мкл
Интактные мыши				
7	$28,2 \pm 1,7$	152 ± 30	$3 \pm 0,7$	$40 \pm 9,0$
Через 7 сут после облучения, 10 Гр \times 2				
7	$26,1 \pm 1,8$	$148,9 \pm 11,6$	$3 \pm 1,2$	$27,9 \pm 6,4$
Через 7 сут после облучения, 2 Гр \times 10				
7	$25,2 \pm 1,6$	$149,4 \pm 21,8$	$2,2 \pm 0,4$	$38 \pm 3,5$
Через 15 сут после облучения, 10 Гр \times 2				
7	$29 \pm 1,2$	$158,6 \pm 19,8$	$2,7 \pm 0,2$	$38,4 \pm 8,4$
Через 15 сут после облучения, 2 Гр \times 10				
7	$26,2 \pm 2,1$	$161,6 \pm 43,0$	$2 \pm 0,5$	$27,7 \pm 6,7$
Через 30 сут после облучения, 10 Гр \times 2				
7	$30 \pm 3,3$	$183,4 \pm 41,5$	$3,2 \pm 1,0$	$34,8 \pm 7,7$
Через 30 сут после облучения, 2 Гр \times 10				
7	$31 \pm 2,0$	$200,8 \pm 60,0$	$2 \pm 0,8$	$35,8 \pm 4,3$

Таблица 2

Значения параметров периферической крови и кариоцитов костного мозга интактных мышей, а также мышей, облученных протонами в суммарной дозе 20 Гр

Количество мышей	Средняя масса тела, г	Гемоглобин, г/л	Лейкоциты, 10^3 мкл	Кариоциты, 10^3 мкл
Интактные мыши				
7	34 ± 3	153 ± 20	$3,1 \pm 0,9$	39 ± 6
Через 15 сут после облучения, 10 Гр \times 2				
7	27 ± 3	164 ± 10	$2,6 \pm 0,6$	32 ± 4
Через 15 сут после облучения, 2 Гр \times 10				
7	28 ± 3	160 ± 24	$2,6 \pm 0,8$	43 ± 12
Через 30 сут после облучения, 10 Гр \times 2				
7	32 ± 1	156 ± 11	$2,8 \pm 1,3$	40 ± 8
Через 30 сут после облучения, 2 Гр \times 10				
7	30 ± 1	143 ± 23	$1,6 \pm 0,5$	40 ± 5

Таблица 3

Поведение мышей через 30 сут после облучения γ -квантами в суммарной дозе 20 Гр

Группа	Число секторов	Центр	ВДА	Груминг	Замирение	Норка	Дефекация	Уринация
Интактные мыши	129	6,3	26	0,3	0	9	2,2	0
10 Гр \times 2	117	5,4	20	2	1,4	2,7	3,4	0
2 Гр \times 10	125	3,8	24,3	1,3	0,8	3,8	1,8	0,2

раметрам не ухудшается до 30 сут, при этом разница в поведении не отличается от поведения мышей после воздействия γ -квантами. Результаты экспериментов, представленных в

табл. 3 и 4, также показали, что поведение мышей не зависит от вида ионизирующего излучения и режима использованного нами фракционированного облучения.

Таблица 4

Поведение мышей через разные сроки после облучения протонами в суммарной дозе 20 Гр

Группа	Число секторов	Центр	ВДА	Груминг	Замирание	Норка	Дефекация	Уринация
Интактные мыши	126	9,5	23	1,2	0,4	6	0,2	0
10 Гр × 2 15 сут	125	7,5	19	1,7	1	3,3	1	0
2 Гр × 10 15 сут	135	4,4	19	1,7	0,9	3	1	0,1
10 Гр × 2 30 сут	107	5,3	21	1,6	0,8	2,5	1,9	0
2 Гр × 10 30 сут	124	6	21	1,3	0,4	2,7	0,6	0

Выводы

На основании полученных в исследовании результатов можно заключить, что выбранный нами вариант экстремального гипофракционирования может успешно заменить традиционное фракционирование, которое в ряде случаев применяется при проведении лучевой терапии опухолей головного мозга. Использование данного вида фракционирования может привести к укорачиванию срока проведения лучевой терапии, а также увеличить пропускную способность радиологических центров.

В заключение следует отметить, что за последние годы уже были успешно проведены клинические испытания с использованием гипофракционирования в тех ситуациях, когда обычно применялись традиционные пролонгированные курсы облучения опухоли [12, 13], в том числе с использованием схемы облучения опухоли – один раз в неделю [14, 15], а также в паллиативной лучевой терапии [16, 17].

Список литературы

1. Бойко А.В., Черниченко А.В., Дарьялова С.Л. и соавт. Нетрадиционное фракционирование дозы // Материалы V Российской онкологической конференции, Москва, 27–29 ноября 2001 года. <http://www.rosoncweb.ru/library/congress/ru/05/46.php>.
2. Grégoire V., Langendijk J.A., Nuyts S. Advances in radiotherapy for head and neck cancer // J. Clin. Onco. 2015. Vol. 33. № 29. P. 3277–3284.
3. В Институте Протонной Терапии Университета Флориды изучают возможности гипофракционирования в протонной терапии. http://protontherapy.ru/v_institute_protonnoj_terapii_universiteta_floridy_izuchajut_vozmozhnosti_gipofrakcionirovania_v_protonnoj_terapii/.
4. Деньгина Н.В. 2015 год в зените: гипофракционирование наступает. <http://www.rosoncweb.ru/news/oncology/2015/>.
5. Восканян К.Ш., Мицын Г.В., Гаевский В.Н. Эффективность биологического действия протонов и гамма-излучения на клетки СЗН10Т1/2 // Авиакосм. и экол. медицина. 2005. Т. 39. № 5. С. 50–53.
6. Генин А.М., Ильин Е.А., Капланский А.С. и соавт. Биоэтические правила проведения исследований на человеке и животных в авиационной, космической и морской медицине // Авиакосм. и экол. медицина. 2001. Т. 35. № 4. С. 14–20.
7. Коблов Л.Ф. Методы и приборы для клинических лабораторных исследований. – М.: Медицина. 1979. 320 с.
8. Savchenko O.V. Status and prospects of new clinical methods of cancer diagnostics and treatment based on particle and ion beams available at JINR // Commun. of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna. 1996. E18-96-124.
9. Пашков В.С., Карсанова С.К., Яснецов В.В. Сравнительное защитное действие радиопротекторов и экранирования при γ -облучении мышей // Авиакосм. и экол. медицина. 2007. Т. 41. № 3. С. 39–43.
10. Brown R.E., Corey S.C., Moore A.K. Differences in measures of exploration and fear in

- MHC-congenic C57BL/6J and B6-H-2K mice // Behavior Genetics. 1999. Vol. 29. № 4. P. 263–271.
11. Щербенко О.И. Отдаленные последствия лучевой терапии опухолей мозга (обзор литературы). http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/sherb2_v12.htm.
 12. Arvold N.D., Tanguturi S.K., Aizer A.A. et al. Hypofractionated versus standard radiation therapy with or without temozolomide for older glioblastoma patients // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2015. Vol. 92. № 2. P. 384–389.
 13. Westover K., Loo Jr. B.W., Gerber D.E. et al. Precision hypofractionated radiation therapy in poor performing patients with non-small cell lung cancer: Phase 1 dose escalation trial // Radiother. Oncol. 2015. Vol. 93. № 1. P. 72–81.
 14. Chargari C., Castro-Pena P., Toledano I. et al. Concurrent use of aromatase inhibitors and hypofractionated radiation therapy // World J. Radiol. 2012. Vol. 4. № 7. P. 318–323.
 15. Dash C., Demas K., Uhm S. et al. Low incidence of fatigue after hypofractionated stereotactic body radiation therapy for localized prostate cancer // Radiat. Oncol. 2012. Vol. 2 (Article 142). P. 1–6.
 16. Matoba M., Oota K., Tonami H. et al. Palliative radiotherapy with 1×8 Gy using conformal radiotherapy for chemotherapy-refractory, recurrent, aggressive lymphomas // Jap. J. Radiol. 2010. Vol. 28. № 3. P. 220–223.
 17. Гуменецкая Ю.В., Мардынский Ю.В., Карякин О.Б., Гулидов И.А. Возможности и перспективы применения ускоренных курсов фракционирования в паллиативной лучевой терапии у больных раком мочевого пузыря // Сибирский онкол. журнал. 2009. Т. 33. № 3. С. 15–19.

EFFECTS OF HYPOFRACTIONATED AND STANDARD FRACTIONATED IRRADIATION OF MICE HEADS WITH GAMMA-RAYS AND PROTONS ON THEIR PHERIPHERAL BLOOD PARAMETERS AND BEHAVIOR

K.Sh. Voskanyan¹, A.V. Rzyanina¹, D.M. Borowicz^{1,2}, G.V. Mitsyn¹, V.N. Gaevsky¹, A.G. Molokanov¹

¹ Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

² Department of Medical Physic, The Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

Experiments were performed to study the action of fractionated irradiation of mice heads with γ -rays and protons on their peripheral blood parameters and behavior by the open field test. Mice were irradiated in two variants of fractionated irradiation: 1) Traditional fractionation (in radiation therapy) – 2 Gy once a day, 5 times a week, the total radiation dose 20 Gy. 2) “Extreme” hypofractionation – 10 Gy once a week, the total radiation dose 20 Gy. The results of the study showed that irradiation of mice heads has no effect on their peripheral blood parameters in both variants of the applied fractionated irradiation and the behavior of mice does not depend on the type of ionizing radiation and the variant of fractionated exposure that we used. On the basis of these results it can be concluded that the option of extreme hypofractionation we have chosen can successfully replace traditional fractionation, which in some cases is applied when carrying out radiotherapy for treating brain tumors. The application of this type of fractionation can lead to shorter terms of radiotherapy and bigger patient capacity of medical centers that conduct radiotherapy.

Key words: radiation therapy, protons, gamma-radiation, brain, mice, traditional fractionation, extreme hypofractionation

E-mail: voskan@jinr.ru