

## ПРОТОННОЕ ОБЛУЧЕНИЕ МЫШЕЙ С АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЭРЛИХА

В.Е. Балакин<sup>1</sup>, С.И. Заичкина<sup>2</sup>, О.М. Розанова<sup>2</sup>, Е.Н. Смирнова<sup>2</sup>, А.Е. Шемяков<sup>1</sup>,  
С.П. Романченко<sup>2</sup>, С.С. Сорокина<sup>2</sup>, Н.С. Стрельникова<sup>1</sup>, Т.А. Белякова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Физико-технический центр Физического института им. П.Н.Лебедева РАН,  
Протвино

<sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Исследовано действие двукратного облучения тонким сканирующим пучком протонов (ТСПП) энергией 85–100 МэВ в суммарной дозе 80 Гр на рост солидной формы асцитной карциномы Эрлиха, а также на продолжительность ремиссии, частоту рецидивов, лучевые реакции кожи и среднюю продолжительность жизни мышей-опухоленосителей. Облучение в дозе 80 Гр определяемого объема опухоли, по сравнению с облучением в дозе 60 Гр, приводило к полной регрессии опухолевых узлов, в два раза снижало частоту рецидивов, при этом не влияло на выживаемость мышей с рецидивами и без них, но увеличивало медиану продолжительности жизни на 35 %. Показано, что из всех характеристик противоопухолевой эффективности для используемой модели опухоли только частота рецидивирования и медиана продолжительности жизни животных зависели от дозы облучения.

Ключевые слова: *протоны, гипофракционирование, тонкий сканирующий пучок, асцитная карцинома Эрлиха, мыши*

### Введение

Протонная терапия (ПТ) опухолей в настоящий момент активно развивается во всем мире. Очевидное преимущество ПТ, связанное с возможностью высокоточного и более эффективного облучения опухолей, делает ее перспективной в качестве альтернативы стандартной лучевой терапии с использованием электронов, гамма- и тормозного излучения. ПТ применяется в первую очередь для лечения опухолей, расположенных близко к критическим органам, и радиорезистентных опухолей, а также злокачественных новообразований у детей. Из-за ограниченного числа центров ПТ количество таких пациентов пока гораздо

меньше числа больных, вылеченных с помощью фотонной терапии, но накопленный клинический материал дает достаточное основание для более широкого ее применения, а также решения важных радиобиологических задач, связанных с получением данных о специфике воздействия ускоренных заряженных частиц на критические структуры и процессы в нормальных и злокачественных клетках при облучении *in vivo*. ПТ имеет неоспоримое преимущество в распределении дозы и характеризуется высокой точностью подведения дозы.

Максимальная часть энергии пучка передается непосредственно в опухоль, не повреждая окружающие здоровые ткани, что значи-

тельно снижает постлучевые последствия [1, 2]. Технология тонкого сканирующего пучка протонов (ТСПП), которая в последние годы приходит на смену методике облучения пассивно рассеянным пучком, повышает эффективность использования потока частиц, поскольку все выпущенные протоны идут на формирование дозного поля, а не поглощаются коллиматорами и другими приспособлениями. Кроме того, данная технология позволяет снизить интегральную лучевую нагрузку на тело пациента в сравнении с другими методами протонной терапии, а также с современными методами фотонной лучевой терапии, что напрямую связано с уменьшением риска осложнений и развития вторичных опухолей [3–6].

Исходя из возможностей протонных ускорителей, где применяется технология ТСПП, становится понятным, что наиболее перспективным направлением совершенствования ПТ, даже при достаточно низких значениях относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов (она составляет в пике Брэгга в среднем 1,1–1,6 в зависимости от линейной потери энергии), уровня дозы, чувствительности объекта и используемого теста, является апробация режимов гипофракционирования и даже применения 1–2 фракций облучения. Это приводит к повышению разовой дозы облучения опухоли, что не только сокращает продолжительность лечения, но и дает возможность использовать новые пути в адронной терапии для преодоления радиорезистентности опухолей и снижения частоты рецидивирования.

К настоящему моменту большинство исследователей пришло к выводу, что эксперименты *in vitro* на отдельных культивируемых линиях клеток, которые послужили основой для определения значения ОБЭ, не позволяют учитывать все реакции многокомпонентной структуры опухолей, состоящей из нормальных, трансформированных и различных стволовых клеток, которые обладают разной радиочувствительностью, или даже разнонаправленными ответами на одни и те же дозы облучения, а также важного влияния окружения опухоли и состояния всего организма [7]. В связи с этим для разработки новых стратегий гипофракционирования ПТ необходимы адекватные экспериментальные модели опухолей на животных, которые позволяют не только оценить противоопухолевую эффективность по стандартным параметрам, но и наблюдать за

рецидивами и развитием отдаленных лучевых реакций в течение всей жизни.

В предыдущей работе нами при облучении солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей 2 фракциями протонов по 30 Гр было показано, что интервалы между фракциями 4–24 ч не влияли на эффективность подавления роста опухоли в течение месяца [8]. При исследовании отдаленных последствий данного режима ПТ было показано, что более высокая противоопухолевая эффективность наблюдалась при облучении определяемого объема GTV по сравнению с облучением планируемого объема PTV. Полученные данные дали основание полагать, что модель солидной карциномы Эрлиха на мышях может быть использована не только для исследования контроля роста опухоли, но и динамики развития ранних и отдаленных постлучевых последствий у мышей [9].

Целью настоящей работы было исследование действия двукратного облучения ТСПП в суммарной дозе 80 Гр на рост солидной формы АКЭ и его отдаленных последствий (продолжительность ремиссии, частота рецидивов, лучевые реакции кожи, средняя продолжительность жизни) у мышей-опухоленосителей.

## Материал и методы

Эксперименты проводили на самцах мышей колонии SHK с массой тела 24–28 г, которых содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях [10]. В каждой группе было по 30 животных. В качестве модели опухолевого роста была использована солидная форма АКЭ, которая является радиорезистентной, быстрорастущей, неместазирующей опухолью мышей [11]. Для перевивки АКЭ мышам вводили суспензию в количестве 2 млн. асцитных клеток внутримышечно в бедро левой лапы. Локальное облучение конечности проводили в водном фантоме на 5-й день после инокуляции, когда опухолевый узел сформировался у всех мышшей.

Перед облучением животных наркотизировали и фиксировали на платформе таким образом, чтобы облучаемая конечность была максимально удалена от тела, затем платформу наклонно погружали в камеру с теплой водой.

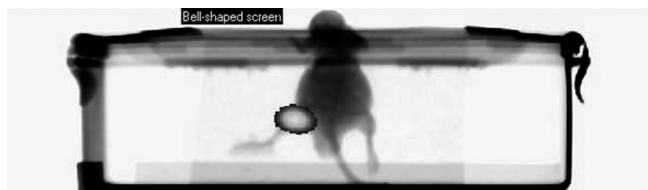


Рис. 1. Положение мыши в водном фантоме во время облучения

На рис. 1 показано положение мыши в водном фантоме во время облучения. Контрольное облучение водного фантома осуществляли с установленными в нем дозиметрами.

Облучение проводили на протонном синхротроне (Комплекс протонной терапии “Прометеус”, ФТЦ ФИАН, Протвино) тонким пучком протонов с двух встречных направлений сканированием по заданному объему ткани в пике Брэгга (рис. 2). Энергия протонов на выходе ускорителя с направления  $0^\circ$  составляла 85–96 МэВ, с направления  $180^\circ$  – 92–100 МэВ, расхождение пучка в этом диапазоне составляло 2,8–3,6 мм. Характерной чертой протонного синхротрона является циклический режим работы, каждый цикл протоны инжектируются в канал, ускоряются до заданной энергии, после чего происходит их выпуск в мишень. После выпуска цикл ускорения повторяется для следующей энергии. Длительность выпуска составляет 200 мс, а весь цикл – 2 с.

Контроль дозы осуществляли дозиметром на основе алмазного детектора (ИФТП, Россия) и радиохромной пленкой ЕВТ2. АКЭ облучали двумя фракциями по 40 Гр с интервалом 24 ч. Для определения объема облучаемой ткани

предварительно получали томограмму мышцы в водном фантоме и с помощью специально разработанной трехмерной программы оконтуривания задавали GTV-объем, равный среднему размеру опухолей  $0,47 \text{ см}^3$ , согласно рекомендациям МКРЕ-62 [12]. Расчет дозы в заданном объеме осуществляли в программе планирования (собственная разработка), основанной на методе Монте-Карло с итеративной динамической оптимизацией по соотношению min/max дозы [13].

После облучения регистрировали показатели противоопухолевой эффективности, характеризующие ранние и отдаленные лучевые последствия: динамику роста АКЭ путем определения объема опухолевого узла еженедельно в течение месяца, ранние лучевые реакции кожи согласно рекомендациям RTOG/EORTC-95 [14], длительность ремиссии, частоту рецидивов АКЭ, среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышей-опухоленосителей. Величина СПЖ была выбрана как интегральный показатель состояния животных, поскольку в ходе предыдущего исследования не удалось выявить достоверно значимого вклада в выживаемость от острых лучевых реакций кожи, и не проводился анализ причин гибели животных от других видов рака, в том числе спонтанных, в отдаленные временные сроки. Животных в терминальном состоянии подвергали эвтаназии, считая этот день датой гибели. Лучевые повреждения кожи купировали в зависимости от формы с помощью консервативной терапии 15 % раствором димексида (ОАО “Татхимфарм-препараты”, Россия), мазями гиоксизон (ОАО “Нижфарм”, Россия) и флуцинар (Польша) [15].

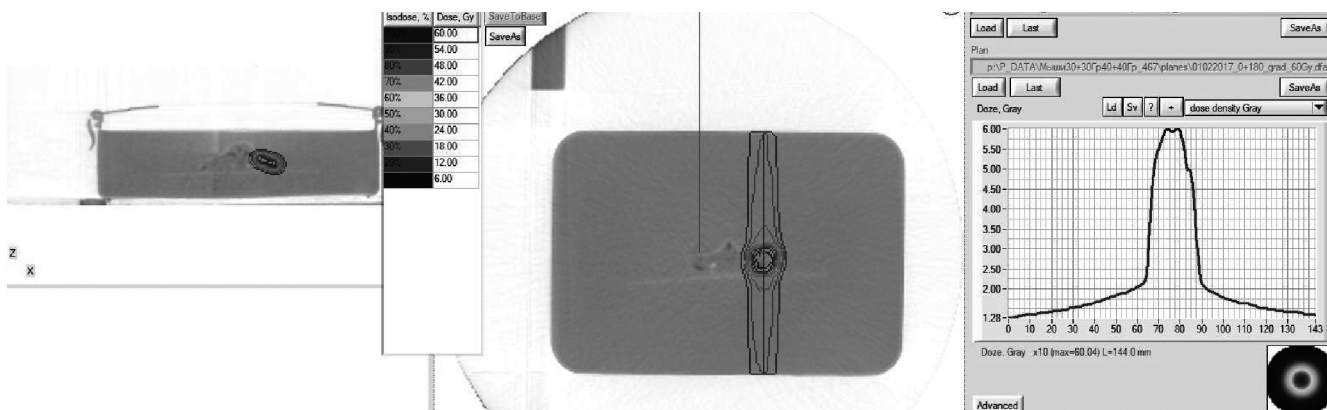


Рис. 2. Распределение дозы в программе планирования при облучении лапы мыши двумя встречными пучками

Растворы и мази применяли ежедневно с момента появления лучевых реакций и до заживления.

Результаты исследования подвергали статистическому анализу с расчетом среднего значения и среднеквадратичной погрешности. Достоверность различий между выборками оценивали с помощью t-критерия Стьюдента в случае распределения, близкого к нормальному, либо критерия Вилкоксона-Манна-Уитни для выборок, где распределение отличалось от нормального. Для сравнения результатов эксперимента, где показатели выражались в долях, достоверность различий оценивали по критерию углового преобразования Фишера [16].

### Результаты и обсуждение

Поскольку в работе [8] была показана высокая противоопухолевая эффективность ТСПП при облучении GTV-объема АКЭ по сравнению с RTV двумя фракциями по 30 Гр, в данном исследовании группа, облученная в таких же условиях, была взята в качестве положительного контроля. При сравнении облучения опухоли в суммарных дозах 60 и 80 Гр на скорость роста АКЭ в течение месяца различий выявлено не было (рис. 3). У большинства животных наблюдали полное подавление развития АКЭ. Через месяц в группе 60 Гр наблюдали регресс опухолевого узла у 77 % мышей, а в группе 80 Гр – у 100 %. В табл. 1 представлены данные по количеству животных, у которых не пальпировались первичные опухолевые узлы через месяц после облучения и не появились рецидивы в течение всего времени наблюдения. Облучение по схеме 40+40 Гр оказалось намного эффективнее в отношении рецидивов: 60 % мышей с 8 до 21 мес были без опухолей по сравнению с 30 % в контрольной группе с облучением 60 Гр.

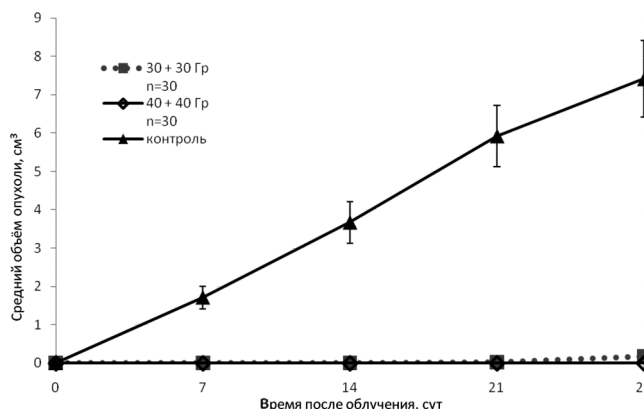


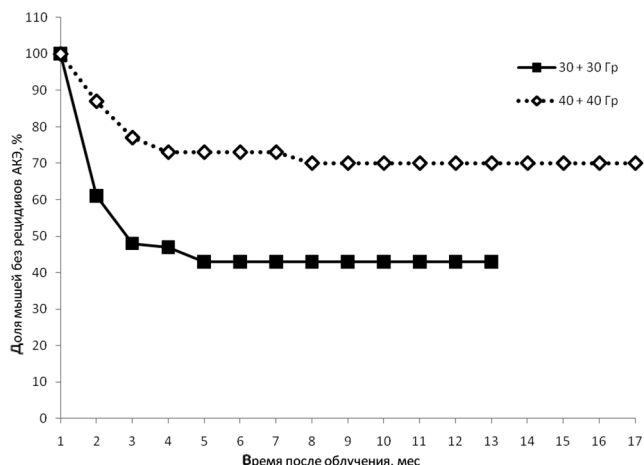
Рис. 3. Динамика роста асцитной карциномы Эрлиха у мышей-опухоленосителей после облучения пучком протонов двумя фракциями по 30 Гр и 40 Гр, в сравнении с необлученными мышами-опухоленосителями

В связи с тем, что пальпируемый объем опухоли был соизмерим с размером лапы животного, и опухолевый узел примыкал к кожным покровам, то при облучении кожа получала значительную дозу. Лучевые реакции кожи начали проявляться на 12 сут после облучения, при этом у 67 % мышей они были 1-й степени (умеренная эритема, эпиляция, сухой эпидермит); у 4,2 % – 2-й степени лучевых поражений (яркая эритема, островковый влажный эпидермит, умеренный отек). Далее тяжесть лучевых поражений нарастала: к 16 сут у 83 % мышей наблюдалась 3-я степень лучевых реакций (сливной влажный эпидермит, отек с вдавливанием), а к 19 сут у 46 % наблюдалась 4-я степень поражений, характеризующаяся появлением язв и некрозов. Острые лучевые реакции быстро регрессировали и шерстяной покров восстановился к 37 сут у 45 % мышей, а к 3 мес после облучения полностью отсутствовали какие-либо изменения кожи. По сравнению с контрольной группой, эти реакции были выражены значительно больше как по частоте встречаемо-

Таблица 1

Доля мышей без опухолей в % в разные сроки после облучения мышей-опухоленосителей тонким сканирующим пучком протонов двумя фракциями по 30 Гр и 40 Гр. Различия от положительного контроля статистически достоверны,  $p < 0,05$

Доза	Месяцы															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	~	21
30 + 30 Гр	77	47	40	37	30	30	30	30	30	30	30	30	30	-	-	-
40 + 40 Гр	100	82	68	64	64	64	64	60	60	60	60	60	60	60	~	60



**Рис. 4.** Динамика появления рецидивов АКЭ у мышей-опухоленосителей после облучения тонким сканирующим пучком протонов двумя фракциями по 30 Гр и 40 Гр

сти, так и по тяжести протекания, и наблюдалось статистически значимое различие ( $p < 0,05$ ). В работе [17] при локальном воздействии  $\gamma$ -излучения в дозе 32 Гр на конечность крысы с опухолью проявления лучевого ожога наблюдались уже на 3–5 сут, к 13 сут после облучения тяжесть лучевых повреждений нарастала, и у 75 % животных была 3 степени. При  $\beta$ -облучении кожи крыс в дозе 60 Гр первые лучевые реакции появлялись на 7 сут и достигали разгара к 12 сут [15]. Таким образом, после облучения в суммарной дозе 80 Гр наблюдали острые лучевые реакции кожи, но их частота и тяжесть протекания была значительно меньше, чем при локальном облучении высокими дозами  $\beta$ - и  $\gamma$ -излучений.

Как видно из рис. 4, через 35 сут появлялись первые случаи рецидивов АКЭ, самые

поздние регистрировались через 150 сут после облучения, срок появления и скорость роста рецидивных опухолей была одинакова в обеих группах. Из результатов, представленных в табл. 2, видно, что средняя продолжительность безрецидивного периода в группах 30+30 Гр и 40+40 Гр составляла 62 и 85 сут соответственно, но различия были статистически недостоверны. Поскольку СПЖ в обеих группах была примерно одинаковой, мы получили средний суммарный показатель СПЖ для мышей с рецидивами – 108 сут, а без рецидивов – 270 сут.

На рис. 5 показана кривая выживаемости мышей-опухоленосителей после ПТ. В обеих группах облученных мышей значимых различий в динамике гибели не наблюдается, но максимальная продолжительность жизни для группы 80 Гр составила 21 мес по сравнению с 15 мес в группе 60 Гр. Медиана продолжительности жизни (время, в течение которого погибает 50 % мышей) для группы 40+40 Гр составила 154 сут, а для контрольной группы – 114 сут.

Ранее нами было высказано предположение о роли опухолевых стволовых клеток в индукции рецидивов [9]. Данные, полученные при использовании дозы 80 Гр, также показали, что за счет сохранения наиболее радиоустойчивых опухолевых или опухолевых стволовых клеток происходит рецидивирование карциномы Эрлиха. В то время как облучение стволовых клеток опухоли высокими дозами протонов в условиях *in vitro* приводит к 100 % гибели [18, 19], в нашей работе в условиях облучения *in vivo* у мышей с инокулированной ранее опухолью и ослабленным иммунитетом, по-видимому, даже единичные стволовые клетки могут приводить к индукции вторичной опухоли. В

**Таблица 2**

**Средняя продолжительность безрецидивного периода и СПЖ мышей после облучения пучком протонов двумя фракциями по 30 Гр и 40 Гр. Различия статистически не достоверны**

Условия облучения (число мышей)	Начало появления рецидивной опухоли после облучения, сут	Средняя продолжительность безрецидивного периода, сут	СПЖ, сут (число мышей)	
			С рецидивами	Без рецидивов
30 + 30 Гр (n=30)	35	62	102 (n=11)	262 (n=12)
40 + 40 Гр (n=22)	35	85	114 (n=9)	279 (n=13)
Среднее	35	73,5	108	270

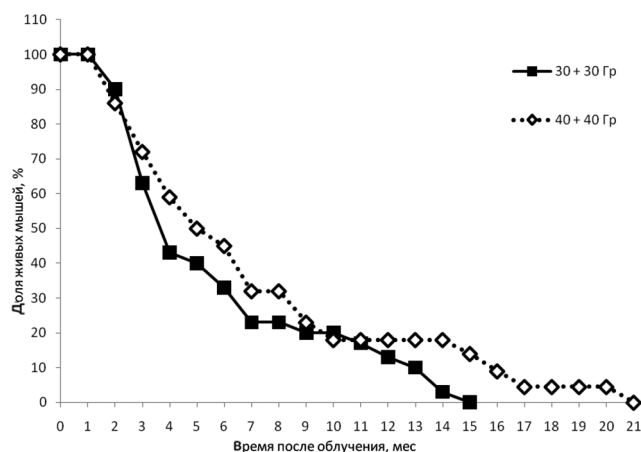


Рис. 5. Динамика выживаемости мышей-опухоленосителей после облучения тонким сканирующим пучком протонов двумя фракциями по 30 Гр и 40 Гр

работе [20] на иммуннодефицитных нокаутных мышцах было также показано, что имплантация даже единичных клеток меланомы человека индуцирует развитие опухоли. Это демонстрирует как ключевую роль иммунитета в онкогенезе вторичных опухолей, так и актуальность изучения эффективности противоопухолевого лечения с использованием моделей на животных.

## Выводы

В результате проведенных экспериментов получены характеристики противоопухолевой эффективности режима двукратного облучения суммарно в дозе 80 Гр объема GTV для модели солидной формы АКЭ: возможность полной регрессии первичных опухолей, в два раза снижение частоты рецидивов, увеличение медианы продолжительности жизни на 35 %, отсутствие влияния на СПЖ мышей с рецидивами и без рецидивов, по сравнению с положительным контролем. Полученные закономерности важны для понимания перспектив развития протонной терапии.

## Список литературы

1. Гулидов И.А. Перспективы развития адронной лучевой терапии // Радиационная онкология и ядерная медицина. 2013. № 1. С. 34–39.
2. Хмелевский Е.В. Лучевая терапия рака простаты: фотоны, протоны или тяжелые ионы // Радиц. онкол. и ядерная медицина. 2013. № 1. С. 28–33.
3. Weber D.C., Ares C., Albertini F. et al. Pencil beam scanning proton therapy for pediatric parameningeal rhabdomyosarcomas: clinical outcome of patients treated at the Paul Scherer Institute // Pediatric Blood & Cancer. 2015. Vol. 63. № 10. P. 1731–1736.
4. Moteabbed M., Yock T.I., Paganetti H. The risk of radiation-induced second cancers in the high to medium dose region: a comparison between passive and scanned proton therapy, IMRT and VMAT for pediatric patients with brain tumors // Phys. Med. Biol. 2014. Vol. 59. P. 2883–2899.
5. van de Water T.A., Bijl H.P., Schilstra C. et al. The potential benefit of radiotherapy with protons in head and neck cancer with respect to normal tissue sparing: a systematic review of literature // Oncologist. 2011. Vol. 16. P. 366–377.
6. Stuschke M., Kaiser A., Abu-Jawad J. et al. Re-irradiation of recurrent head and neck carcinomas: comparison of robust intensity modulated proton therapy treatment plans with helical tomotherapy // Radiat. Oncology. 2013. Vol. 8, № 1, P. 93–100.
7. Матчук О.Н., Орлова Н.В., Замулаева И.А. Изменение относительного количества клеток SP меланомы линии B16 после облучения *in vivo* // Радиц. биология. Радиоэкология, 2016. Т. 56. № 5. С. 487–493.
8. Балакин В.Е., Шемяков А.Е., Заичкина С.И. и соавт. Гипофракционированное облучение солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей тонким сканирующим пучком протонов // Биофизика, 2016. Т. 61. № 4. С. 808–812.
9. Балакин В.Е., Шемяков А.Е., Заичкина С.И. и соавт. Отдаленные лучевые последствия после гипофракционированного облучения протонами солидной карциномы Эрлиха у мышей // Биофизика, 2017. Т. 62. № 1. С. 161–167.
10. Smith J.A., van den Broek F.A., Martorell J.C. et al. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of the FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments // Laboratory Animals, 2007. Vol. 41. № 2, P. 143–160.

11. Инжеваткин Е.В. Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха. Метод. разработка. – Красноярск: КГУ. 2004. 10 с.
12. ICRU Report 62. Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy. International Commission on Radiation Units and Measurements. 1999. 52 pp.
13. Ульяненко С.Е., Лычагин А.А., Корякин С.Н. и соавт. Распределение дозы и ЛПЭ в биологических объектах при облучении протонами // Мед. физика. 2018. № 1(77). С. 68–74.
14. Cox J.D., Stetz J., Pajak T.F. Toxicity criteria of the RTOG and EORTC. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1995. Vol. 31. № 5. P. 1341–1346.
15. Легеза В.И., Гребенюк А.Н., Кондаков А.Ю., Заргарова Н.И. Сравнительная оценка эффективности ранозаживляющих средств при местных и сочетанных радиационных поражениях в эксперименте // Радиационная биология. Радиоэкология, 2015. Т. 55. № 6. С. 584–590.
16. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Ленинград: Медицина. 1978. 296 с.
17. Филимонова М.В., Ульяненко С.Е., Шевченко Л.И. и соавт. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтазы T1023: II. Способность к селективной защите нормальных тканей при лучевой терапии новообразований // Радиационная биология. Радиоэкология, 2015. Т. 55. № 3. С. 260–266.
18. Narang H., Kumar A., Bhat N. et al. Effect of proton and gamma irradiation on human lung carcinoma cells: Gene expression, cell cycle, cell death, epithelial-mesenchymal transition and cancer-stem cell trait as biological endpoints // Mutat. Res. 2015. Vol. 780. P. 35–46.
19. Zhang X., Lin S.H., Fang B. et al. Therapy-resistant cancer stem cells have differing sensitivity to photon versus proton beam radiation // J. Thorac. Oncol. 2013. Vol. 8. № 12, P. 1484–1491.
20. Quintana E., Shackleton M., Sabel M.S. et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells // Nature. 2008. Vol. 456. № 4, P. 593–599.

#### IRRADIATION OF THE SOLID EHRlich ASCITES CARCINOMA IN MICE WITH PROTON BEAMS

V.E. Balakin<sup>1</sup>, S.I. Zaichkina<sup>2</sup>, O.M. Rozanova<sup>2</sup>, E.N. Smirnova<sup>2</sup>, A.E. Shemyakov<sup>1</sup>,  
S.P. Romanchenko<sup>2</sup>, S.S. Sorokina<sup>2</sup>, N.S. Strelnikova<sup>1</sup>, T.A. Belyakova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Physical Technical Center, P.N. Lebedev Physical Institute of RAS, Moscow reg., Protvino, Russia

<sup>2</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Moscow reg., Pushchino, Russia

The effect of irradiation with a pencil scanning beam of protons at a total dose of 80 Gy on the growth of solid Ehrlich ascites carcinoma, the duration of remission, frequency of recurrence, radiation-induced skin damage, and the mean life span (MLS) in tumor-bearing mice have been studied. The irradiation of GTV at a dose of 80 Gy led to the complete regression of tumor nodes, a twofold decrease in the frequency of recurrences without affecting the MLS of mice with and without relapses but increased the median of life span by 35 %. It was shown that, of all characteristics of the antitumor irradiation efficacy for the tumor model used, only the frequency of recurrence and the median of life span of animals depended on the radiation dose.

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

E-mail: [rozanova.iteb@gmail.com](mailto:rozanova.iteb@gmail.com)