

ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ВЫСОКИХ ДОЗ ОБЛУЧЕНИЯ НА КУЛЬТИВИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Н.А. Антпина, Г.Ю. Смирнов, А.А. Николаева, А.С. Беляшова,
Г.В. Павлова, А.В. Голанов
НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко, Москва

Описана система для реализации радиобиологических экспериментов *in vitro* при однократном облучении высокими дозами: используемое оборудование и его характеристики, особенности использованных культивированных клеток, параметры пучка (энергия, мощность, размер поля и пр.), диапазон доз и шаг измерений для построения кривой доза-эффект, создание условий равномерного облучения клеток.

Ключевые слова: облучение культивированных клеток, глиобластома, радиохирургия

Введение

В последние годы в результате анализа клинических данных об особенностях реакции здоровых и опухолевых тканей на разные режимы радиационных воздействий, появился интерес к исследованию возможности существенного увеличения разовых доз (до 6–24 Гр) при лучевой терапии глиобластом. Глиобластома является одной из наиболее распространенных, злокачественных и летальных первичных опухолей головного мозга с неблагоприятным прогнозом. Клиническое применение радиохирургии и гипофракционирования при лучевой терапии глиобластом на сегодняшний день является апробируемым методом и одним из актуальных направлений научного поиска.

Известно, что увеличение дозы за фракцию даёт хороший противоопухолевый эффект при облучении других злокачественных новообразований, а малое число фракций позволяет сократить суммарное время лечения. Но подведение высоких разовых доз к диффузным

образованиям в клинической практике используется крайне редко, т.к. при этом в облучаемый объем необходимо включать нормальные ткани мозга, прилегающие к области измененного сигнала на МРТ или ПЭТ. Обычно $STV = GTV + 1-2$ см. Лучевая терапия в режиме радиохирургии и гипофракционирования применяется только при рецидивах глиобластом, т.к. считается, что суммарная доза, подведенная за два курса облучения, не должна превышать 100 Гр [1].

Важной составляющей данных исследований являются эксперименты на биологических моделях *in vitro*, которые способны воспроизводить и имитировать опухолевые ткани. В отделении радиотерапии и радиохирургии НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко проводится экспериментальное исследование радиобиологических свойств клеток глиобластомы человека с математическим моделированием антипролиферативной эффективности фотонного облучения в различных режимах гипофракционирования (1, 3, 5 фракций) суммарными дозами 1–250 Гр. Изучаемым эффек-

том является подавление метаболической и пролиферативной активности клеток глиобластом в результате их облучения *in vitro*.

Для получения репрезентативных результатов важно тщательное планирование и качественная реализация эксперимента. Одной из задач подготовительного этапа и первого года исследования была отработка методики проведения облучения культуры клеток в режиме радиохирургии. Подбор и варьирование параметров пучка (энергия, мощность, размер поля и пр.), адекватный диапазон доз и шаг измерений для построения кривой доза-эффект, создание условий равномерного облучения культуры клеток, – все это оказывает существенное влияние на результаты эксперимента и может заметно изменить последующие выводы.

В настоящей работе описана система для реализации радиобиологических экспериментов (облучения *in vitro*): оборудование, клеточные культуры, параметры проводимого облучения, позволяющие максимально воспроизвести клинические условия.

Современное состояние проблемы

Определение клоногенной способности клеток является одним из методов исследования реакции клеток опухоли на облучение. Количественно реакцию тканей на воздействие ионизирующего излучения можно выразить, измерив зависимость доли пролиферирующих клеток от дозы радиации и построить кривые доза-эффект. Стандартным методом оценки пролиферативной активности, применяемым другими исследователями, является МТТ-тест. Это колориметрический тест, основанный на способности бесцветной соли тетразолия восстанавливаться в присутствии митохондриальных ферментов живых клеток до окрашенного в пурпурный цвет формазана. Измеряется оптическая плотность раствора формазана, при длине волны 530 нм.

В работе [2] изучены основные биологические показатели (скорость пролиферации, инфильтрационные и миграционные свойства) глиобластом человека на животной модели после облучения подпороговой лечебной дозой (50 Гр однократно). Было показано, что такая доза, приводит к значительному усилению как пролиферации (уровень фактора Ki-67 возрос с 25 до 75 %), так и инфильтрационных и миграционных свойств. Таким образом, подведение

недостаточных доз может приводить к значительно более агрессивному поведению опухоли и приводить к её быстрому восстановлению.

Дополнительным фактором, усложняющим анализ и интерпретацию экспериментальных данных, является наличие в реальных опухолях гетерогенных по радиочувствительности клеточных популяций. В работе [3] было показано что клеточные линии, полученные из биопсийного материала одной и той же глиомы, обладают разной радиочувствительностью.

Важным объектом исследования на сегодняшний день является повышение радиорезистентности клеток в культуре после облучения. В работе [4] исследованы процессы возникновения субпопуляций клеток глиомы человека (U-251 MG-No) в результате подведения последовательных фракций по 2, 4, 6 и 9 Гр (промежуток между фракциями 1–2 недели). Данное воздействие привело к возникновению ряда субпопуляций, из них 39 % обладали повышенной радиочувствительностью и лишь 7 % являлись радиорезистентными, причём разница в свойствах сохранялась (диапазон до 0–12 Гр), а уровень восстановления потенциально летальных повреждений был значительно выше у радиорезистентных клонов.

Некоторые авторы демонстрируют зависимость эффективности воздействия излучения не только от величины дозы, но и от времени воздействия и количества фракций [5, 6]. Первичные данные были получены *in vitro* на культурах клеток и *in vivo* на животных. Воздействие ионизирующего излучения на клеточную культуру часто приводят к возникновению мутаций и появлению субпопуляций клеток с отличными от родительских свойствами, в том числе и радиочувствительностью.

Материал и методы

Исходя из опыта других исследователей, нами был сформирован перечень изучаемых параметров и явлений, а также набор параметров пучка и условий измерений, которые максимально соответствовали бы задачам исследования:

1. Построить кривые доза-эффект при облучении культуры клеток однократно высокими разовыми дозами. Для этого, в соответствии с опытом других исследователей, изначально

но был выбран диапазон разовых доз 1–80 Гр. Затем, в соответствии с первыми полученными результатами, максимальная доза была увеличена до 250 Гр.

2. Оценить изменение радиочувствительности культуры клеток при повторном облучении. Для этого одна из культур клеток была выращена из материала ранее облученной опухоли.
3. Изучить влияние длительности фракции облучения на эффект. С этой целью культуры клеток облучались с двумя разными мощностями дозы: 200 МЕ/мин и 600 МЕ/мин.
4. Построить кривые доза-эффект при облучении культуры клеток за 3 и 5 фракций и определить изоэффективные уровни. По LQ-модели были определены ориентировочные промежутки разовых доз для этих режимов: 1–430 Гр за 3 фракции и 1–550 Гр за 5 фракций.

Исследовались пролиферативная и метаболическая активность частично перевиваемых культур клеток, выращенных из гистологического материала двух опухолей (глиобластом), удаленных у пациентов в НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко. Один из пациентов (пациент Г.) оперировался по поводу рецидива заболевания. За 2 года до операции он проходил курс лучевой терапии на ту же область. Второй пациент (С.) до операции не облучался. Полученные культуры не являлись монокультурами (как в большинстве других исследований), а представляли из себя гетерогенные клеточные популяции, содержащие в том числе и стволовые клетки, что несколько приближало эксперимент к облучению реальных опухолей.

Для определения степени воздействия высокодозного фотонного облучения на культуру клеток проводился МТТ-тест и иммуногистохимический анализ (оценка пролиферативной активности клеток), а также ПЦР в реальном времени для оценки экспрессии онкомаркеров (оценка метаболической активности клеток). Для перечисленных тестов облучался монослой культуры клеток, в специальных одноразовых пластиковых емкостях разной формы и объема. Выращивание культуры клеток до стадии возникновения монослоя (клетки располагаются плотно друг к другу, в один слой покрывая дно экспериментальных емкостей) обеспечивает приближение поведения клеток в культуре к поведению ткани. Для каждого из выбранных

параметров пучка проводилось облучение 96-луночного планшета, двух матрасов, и чашки Петри (рис. 1). Необходимо было обеспечить однородное дозовое распределение исследуемом объеме.

В большинстве исследований реакции культуры клеток на облучение во время подведения дозы емкость с культурой клеток помещалась между пластинами “твердой воды”: 2–3 см сверху и 5–10 см снизу. Обычно используется один вертикальный пучок фотонного из-

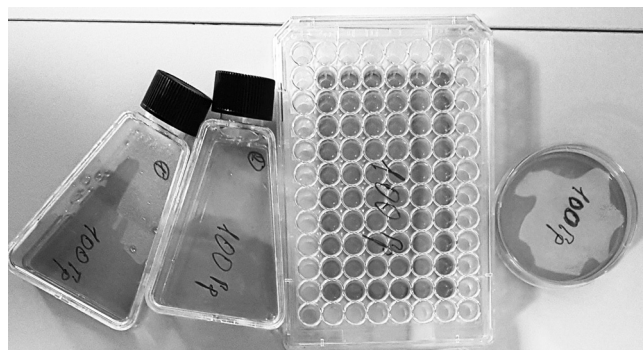


Рис. 1. Различные виды пластиковых емкостей для культуры клеток

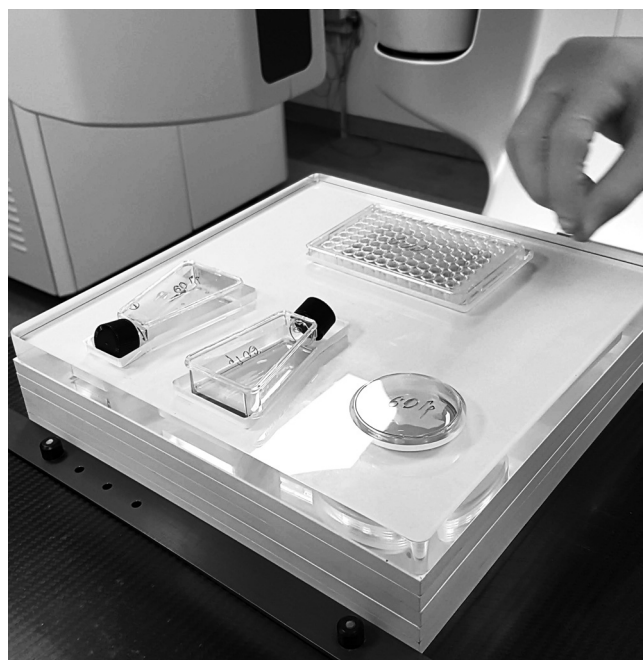


Рис. 2. Водозвивалентный фантом с углублениями для размещения культуры клеток

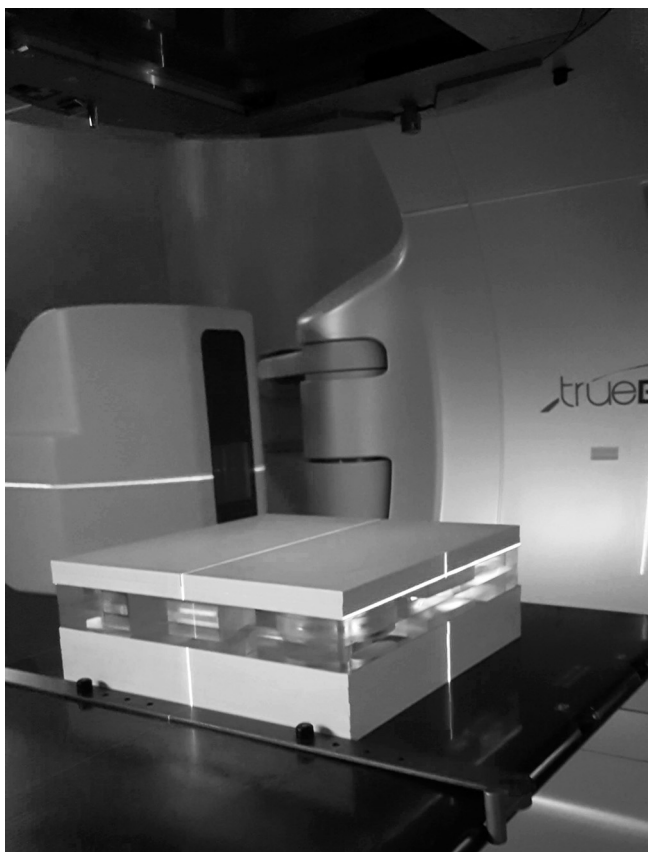


Рис. 3. Общий вид экспериментальной установки

лучения. На подготовительном этапе нами было проведено облучение 96-луночного планшета с культурой клеток в аналогичных условиях. По результатам проведенного затем МТТ-теста, разброс в значениях оптической плотности, измеренной в центральных и крайних лунках планшета, был очень высок и достигал 88 %. Был сделан вывод о необходимости обеспечения гомогенной среды вокруг облучаемых емкостей.

Для качественного проведения эксперимента был изготовлен специальный фантом из плексигласа (30×30×3 см) (рис. 2), состоящий из двух плит одинакового размера (30×30×1,5 см), в которых с помощью лазерной резки были созданы углубления, совпадающие по форме с емкостями для культуры клеток. Это позволило добиться максимально однородного дозового распределения в суспензии клеток. Материал фантома характеризовался числом Хаусфилда = 110. Для исключения неравномерного воздействия в

области build up сверху на фантом накладывались 2 пластины “твердой воды”, общей толщиной 2 см, снизу – 5 см твердой воды (рис. 3).

Вся конструкция фантома из «твердой воды» и емкостей с водой вместо культуры клеток сканировалась на КТ Optima для получения точных геометрических параметров фантома и значения электронных и массовых плотностей в каждой его точке. Результаты КТ-исследования загружались в систему планирования Eclipse для расчета дозовых распределений.

Облучение проводилось на линейном ускорителе True Beam (Varian, USA). Аппарат используется для лечения пациентов и регулярно проходит все необходимые процедуры гарантии качества пучка. Фантом облучался одним вертикальным пучком тормозного излучения с номинальной энергией 6 МэВ, мощностью дозы 600 и 200 МЕ/мин. Облучение проводилось однократно. Размер поля 32×32 см позволил обеспечить равномерное облучение всего объема культуры клеток (рис. 4). РИП=98 см. Некоторые исследователи для повышения гомогенности дозового распределения в облучаемой суспензии используют два встречных поля (угол поворота гантри = 0° и 180°) [7]. Но поскольку в нашем случае клетки образовывали монослой и располагались в виде тончайшего слоя, покрывающего дно емкостей, не было необходимости использовать два поля.

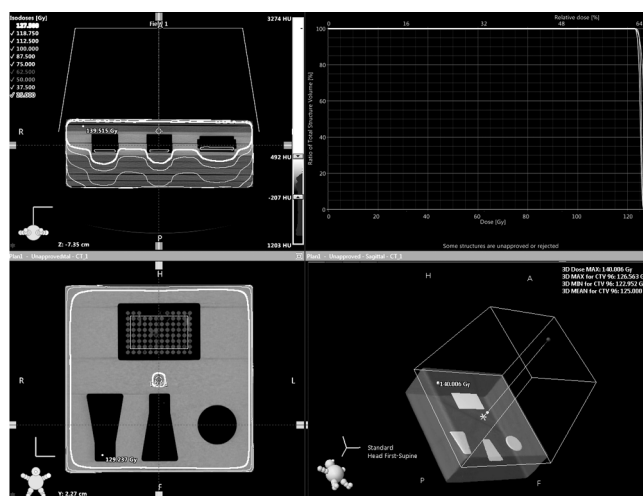


Рис. 4. Дозовое распределение, рассчитанное в системе планирования

Мощность дозы 600 МЕ/мин является наиболее используемой при лечении пациентов, поэтому она являлась основной в данном исследовании. На данной мощности были отпущены дозы: 1,3, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 125, 150, 200, 250 Гр. Набор доз несколько варьировался в зависимости от облучаемой культуры. Длительность облучения в зависимости от дозы составила от 10 с (1 Гр), до 43 мин (250 Гр).

Поскольку одной из задач исследования являлось изучение влияния времени облучения, то была использована также более низкая мощность пучка. С мощностью дозы 200 МЕ/мин были отпущены 5, 20, 80, 150 и 200 Гр. Длительность облучения составила от 10,5 мин (20 Гр), до 105 мин (200 Гр).

Для всех проведенных экспериментов существовала контрольная емкость с клетками, которая не подвергалась облучению, но содержалась в тех же условиях, включая транспортировку между биологической лабораторией в Центром нейрохирургии.

Эффект от радиационного воздействия измерялся с помощью МТТ-теста, который позволяет оценить пролиферативную активность клеточной популяции. Интенсивность окрашивания и оптическая плотность суспензии характеризовали пролиферативную активность клеток после подведения к ним различных доз, а также при изменении мощности излучения.

Результаты и обсуждение

Использование специально изготовленного водэквивалентного фантома позволило принципиально увеличить гомогенность и воспроизводимость полученных результатов. При анализе метаболической активности клеток в каждой из ячеек 96-луночного планшета разброс измеренных значений оптической плотности составил от 8 до 15 % для разных параметров облучения.

По результатам оценки пролиферативной активности культуры клеток глиобластомы пациента С., не проходившего ранее курс лучевой терапии, были построены кривые доза-эффект для двух различных значений мощности дозы (600 МЕ/мин и 200 МЕ/мин) (рис. 5).

При облучении культуры клеток глиобластомы пациента С., наблюдается резкое уменьшение пролиферативной активности клеток на промежутке от 1 до 40 Гр (за исключением

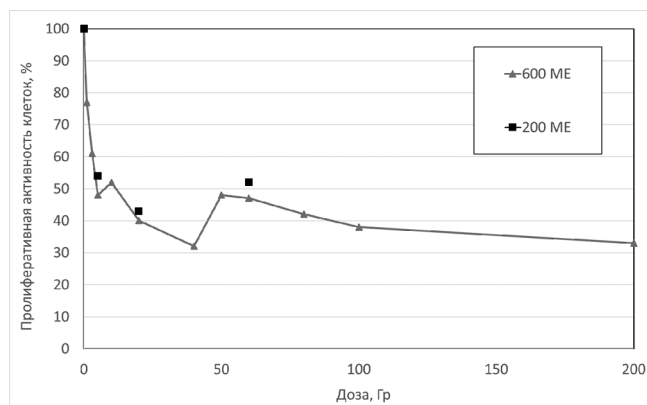


Рис. 5. Зависимость числа пролиферирующих клеток от дозы для культуры клеток опухоли пациента С при мощности пучка 600 МЕ/мин и 200 МЕ/мин

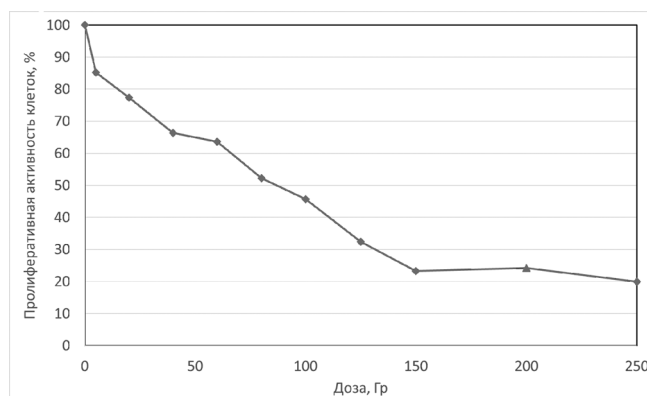


Рис. 6. Зависимость числа пролиферирующих клеток от дозы для культуры клеток опухоли пациента Г

небольшого всплеска при 10 Гр). В связи с этим были скорректированы условия измерений и данный промежуток промерялся с меньшим шагом для более детального изучения. При дозе 40 Гр пролиферативная активность составляет 32 %. Затем наблюдается значительный подъем кривой (до 48 %) и последующий пологий спад до 200 Гр. В точке максимальной подведенной дозы количество клеток, сохраняющих метаболическую активность составляет 33 %. Такой высокий показатель свидетельствует о наличии пула клеток с очень высокой радиорезистентностью. Впоследствии из клеток, облученных дозой 200 Гр удалось вырастить жизнеспособную культуру.

Сравнительные результаты подведения дозы с разной мощностью демонстрируют снижение эффективности при возрастании времени облучения. Увеличение времени подведения дозы в три раза приводит к уменьшению эффективности в среднем на 9,2 %.

Оценка пролиферативной активности культуры клеток глиобластомы пациента Г., который за два года до хирургического удаления исследуемой опухоли прошел стандартный курс лучевой терапии показал, что данная культура обладает существенно более высокой радиорезистентностью, нежели не облучавшаяся ранее (рис. 6).

Эффект от облучения радиорезистентной культуры клеток, по всей видимости модифицированной первичным облучением, нарастает с увеличением дозы гораздо медленнее. Пролиферативная активность культуры клеток опухоли пациента Г. плавно снижается на и достигает значения 23 % при 150 Гр. Некоторое изменение крутизны кривой наблюдается при 60 Гр. На промежутке 150–250 Гр эффект остается практически постоянным. При дозе 200 Гр пролиферативная активность незначительно возрастает (на 1 %). В точке максимальной подведенной (250 Гр) дозы количество клеток, сохраняющих метаболическую активность составляет 20 %. Возможно, имеет смысл в последующих экспериментах еще увеличить подводимые дозы. Из клеток пациента Г., получивших 200 Гр в результате эксперимента и 60 Гр ранее также удалось вырастить культуру.

Выводы

Детальная проработка технологии проведения радиобиологического эксперимента привела к следующим выводам:

1. Облучение культур клеток, помещенных в специализированный водоеквивалентный фантом, принципиально улучшает качество и достоверность получаемых в результате эксперимента данных.
2. Диапазон доз, подводимых культуре клеток, и шаг измерения для полноты получаемых данных должен варьироваться в зависимости от ожидаемых показателей радиочувствительности.
3. Эффективность облучения с меньшей мощностью ниже, независимо от подведенной дозы.

4. Необходимо дальнейшее разностороннее изучение радиорезистентного пула клеток.

Кроме того, результаты данной серии экспериментов могут влиять на стратегию проведения лучевой терапии у пациентов с глиобластомами:

1. Эскалация дозы с какого-то момента перестает вызывать уменьшение числа метаболически активных клеток. Это согласуется с мнением некоторых клиницистов, считающих неэффективным увеличение суммарной дозы в мишени выше 60 Гр (за 30 фракций) при облучении глиобластом у пациентов.
2. Радиочувствительность клеток заметно снижается при повторном облучении. Поэтому проведение лучевой терапии в стандартном режиме при локальном рецидиве малоэффективно. Тем более, если суммарная доза снижается до 40 Гр.
3. В связи с продемонстрированной низкой эффективностью повторного облучения в режиме радиохирургии, необходимо изучить гиподифракционированные режимы с увеличением суммарной подведенной дозы.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-29-01061 “Моделирование радиобиологического ответа клеточных культур глиобластом на различные режимы облучения на основе молекулярно-генетических характеристик опухоли с оценкой уровня экспрессии мРНК гена RAD51, апоптоза и пролиферативной активности”.

Список литературы

1. Mayer R., Sminia P. Reirradiation tolerance of the human brain // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008. Vol. 70. № 5. P. 1350–1360.
2. Shankar A., Kumar S. Subcurative radiation significantly increases cell proliferation, invasion, and migration of primary glioblastoma multiforme in vivo // *Chin. J. Cancer.* 2014. Vol. 33. № 3. P. 148–158.
3. Yang X, Darling JL, McMillan TJ, Peacock JH, Steel GG. Heterogeneity of radiosensitivity in a human glioma cell line // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1992. Vol. 22. № 1. P. 103–108.
4. Wang J., Hu L, Gupta N. et al. Induction and characterization of human glioma clones with different radiosensitivities // *Neoplasia.* 1999. Vol. 1. № 2. P. 138–144.

5. Kondziolka D., Patel A., Lunsford L.D. et al. Stereotactic radiosurgery plus whole brain radiotherapy versus radiotherapy alone for patients with multiple brain metastases // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1999. Vol. 45. № 2. P. 427–434.
6. Brenner D.J. Semin The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining isoeffective doses at large doses per fraction // Radiat. Oncol. 2008. Vol. 18. № 4. P. 234–239.
7. Tesei A., Sarnelli A., Arienti C. et al. In vitro irradiation system for radiobiological experiments // Radiat. Oncol. 2013. Vol. 1. № 8. P. 257.

PHYSICAL AND TECHNICAL ASPECTS OF EXPERIMENTAL STUDY OF THE HIGH DOSES IRRADIATION EFFECTS ON THE HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS CULTURE

*N.A. Antipina, G.Yu. Smirnov, A.A. Nikolaeva, A.S. Belyashova, G.V. Pavlova, A.V. Golanov
N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, Russia*

This paper describes a system for implementing radiobiological experiments *in vitro* with a high doses single fraction: the equipment used and its characteristics, cell culture parameters, beam parameters (energy, power, field size, etc.), dose range and measurement step to build dose / effect curve, creating conditions for uniform irradiation of cells.

Key words: *cell culture irradiation, glioblastoma, radiosurgery*

E-mail: nantipina@nsi.ru