

## МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВЫХ ЛУЧЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

А.А. Липенгольц<sup>1,2,3</sup>, Е.В. Калашишникова<sup>3</sup>, В.А. Скрибицкий<sup>3</sup>, Т.К. Лобжанидзе<sup>4</sup>,  
А.В. Смирнова<sup>1</sup>, В.В. Васильева<sup>3</sup>, Е.С. Воробьева<sup>2</sup>, Е.Ю. Григорьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
им. Н.Н. Блохина, Москва

<sup>2</sup> Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна, Москва

<sup>3</sup> Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва

<sup>4</sup> Научно-исследовательский институт технической физики  
и автоматизации, Москва

Проведено исследование зависимости четырех наиболее используемых количественных параметров противоопухолевого эффекта (коэффициента торможения роста опухоли, индекса роста, времени задержки роста опухоли и логарифма числа погибших клеток) от величины поглощенной дозы рентгеновского излучения. Исследование проведено для трех значений поглощенной дозы (10, 20 и 25 Гр), обеспечивающих противоопухолевый эффект от слабо выраженного (+) до сильно выраженного (++++). Облучение проводилось на рентгеновском аппарате с максимальным напряжением 225 кВ. Было установлено, что в диапазоне исследованных значений поглощенной дозы время задержки роста опухоли и логарифм числа погибших клеток имеют нелинейную зависимость от величины поглощенной дозы, тогда как коэффициент торможения роста опухоли и индекс роста могут быть аппроксимированы линейной функцией с  $R^2=0,99$ .

Ключевые слова: *противоопухолевый эффект, in vivo, лабораторные животные, аденокарцинома Ca755, коэффициент торможения роста опухоли, индекс роста, рентгеновское излучение*

### Введение

Разработка новых методов лучевой терапии является одним из направлений повышения эффективности лечения злокачественных новообразований. Стратегию увеличения терапевтической эффективности воздействия ионизирующего излучения на опухоль можно

разделить на два направления: увеличение биологически эквивалентной дозы в опухоли и снижение радиорезистентности опухолевых тканей. Увеличение эквивалентной дозы в опухоли может быть получено как путем увеличения физической поглощенной дозы, так и использованием плотноионизирующего излучения с ОБЭ более единицы. Для снижения ра-

диорезистентности опухолевых тканей могут быть использованы препараты радиосенсибилизаторы, либо различные радиосенсибилизирующие воздействия, а также их комбинации. В технологиях нейтрон-захватной терапии (НЗТ) и фотон-захватной терапии (ФЗТ) увеличение биологически эквивалентной дозы осуществляется путем доставки в опухоль специальных дозоповышающих препаратов, которые при облучении опухоли определенным типом внешнего ионизирующего излучения обеспечивают увеличение поглощенной дозы [1–3]. Таким образом, для НЗТ и ФЗТ, а также при использовании радиосенсибилизаторов важным параметром эффективности терапии является отношение величин поглощенных доз, обеспечивающих одинаковый противоопухолевый эффект, в случае введения дозоповышающего/радиосенсибилизирующего препарата и при его отсутствии:

$$K = D/D_0, \quad (1)$$

где  $D$  и  $D_0$  – величины поглощенной дозы, обеспечивающие одинаковый противоопухолевый эффект при наличии и отсутствии препарата в опухоли соответственно.

Использование для определения параметра  $K$  выживаемости опухолевых клеток, получаемой в *in vitro* исследованиях, не всегда возможно для технологий с дозоповышающими или радиосенсибилизирующими препаратами, так как многие факторы, влияющие на терапевтическую эффективность конкретной исследуемой технологии, часто не могут быть воспроизведены в условиях *in vitro*. Также, существенно меньшее количество опухолевых клеток, используемых в исследованиях *in vitro* по сравнению с количеством клеток в опухолевых *in vivo* моделях лабораторных животных не позволяют использовать *in vitro* исследования для оценки эффективности противоопухолевой терапии новых методов при больших значениях итоговой формируемой поглощенной дозы. Таким образом, проведение исследований противоопухолевой эффективности на лабораторных животных *in vivo* при разработке и доклинических исследованиях новых методов лучевой терапии, использующих дозоповышающие/радиосенсибилизирующие препараты, является необходимым этапом. В отличие от исследований *in vitro*, в которых количественным критерием противоопухолевой эффективности является выживаемость опухолевых клеток после терапевтического воздей-

ствия, в *in vivo* исследованиях на лабораторных животных оценить непосредственно количество выживших опухолевых клеток в опухолевом узле после терапевтического воздействия невозможно. Предлагаемые для этого флуоресцентные [4] и радионуклидные [5–7] методы в настоящее время не обладают достаточной точностью, а также сами метки могут влиять на итоговый результат эксперимента, оказывая на опухоль дополнительное тормозящее или стимулирующее действие.

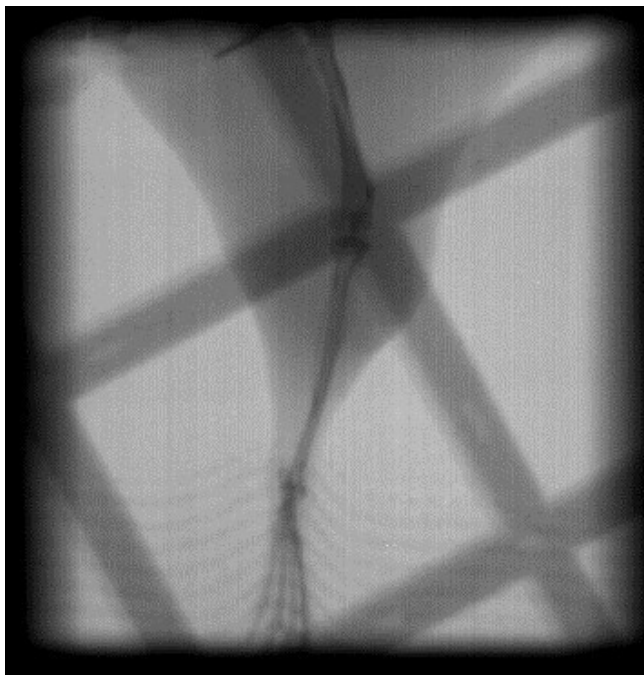
В исследованиях на лабораторных животных *in vivo* одним из основных критериев противоопухолевого действия является динамика роста опухолевого узла после проведения терапии. Для количественной оценки противоопухолевого эффекта используют целый ряд параметров, вычисляемых на основе либо объема опухоли, либо кинетических параметров изменения объема опухоли [8, 9]. Характер зависимости большинства существующих противоопухолевых параметров от величины поглощенной дозы до настоящего момента не исследован.

Чтобы установить характер зависимости основных параметров противоопухолевого эффекта от величины поглощенной дозы, в данной работе было проведено исследование противоопухолевого эффекта рентгеновского излучения на опухолевой модели мышей при облучении в разных дозах, обеспечивающих разную степень торможения роста опухолевых узлов по сравнению с необлученным контролем.

## Материал и методы

### Опухолевая модель

Исследование проводилось на мышам-самках линии С57В1/6 (питомник лабораторных животных “Пушино”) с массой тела 20–22 г и перевитой подкожно на правую заднюю лапу аденокарциномой молочной железы Са755. Перевивка опухолей осуществлялась подкожной инъекцией 14 % суспензии опухолевых клеток в питательной среде Хенкса. Объем вводимой суспензии составлял 50 мкл. По достижению опухолями объема 150–200 мм<sup>3</sup> были сформированы 4 группы по 6 животных: контрольная и облученные в дозах 10, 20 и 25 Гр.



**Рис. 1.** Рентгеновское изображение лапы мыши с опухолью в облучаемом поле

### Облучение

Облучение животных проводилось на рентгеновском аппарате Comet MXR/225/22 при максимальном напряжении 225 кВ и с алюминиевым фильтром 1 мм. Расстояние от источника излучения до облучаемой опухоли составляло 26 см. Мощность дозы при проведении облучения составляла 4,6 Гр/мин. Размер поля рентгеновского излучения составлял ~40×40 мм. Лапа с опухолевым узлом при облучении располагалась таким образом, чтобы в поле излучения находился участок ниже тазобедренного сустава. Контроль позиционирования лапы мыши в поле излучения осуществлялся при помощи рентгеновского плоскопанельного детектора (рис. 1). Облучение проводилось в дозах 10, 20 и 25 Гр, обеспечивающих противоопухолевый эффект от слабо выраженного (+) до сильно выраженного (++++) [8, 9]. Контроль поглощенной дозы на облучаемую лапу проводился при помощи дозиметрических пленок Gafchromic EBT3, размещаемых на верхней поверхности облучаемой лапы и под ней.

### Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевая эффективность воздействия оценивалась по изменению средних

объемов опухоли у облученных и контрольных животных. Измерение объема опухоли у каждого животного осуществлялось один раз в два дня при помощи штангенциркуля. Объем опухоли вычислялся по формуле эллипсоида:  $V = (\pi/6) \cdot a \cdot b \cdot c$ , где  $a$ ,  $b$ ,  $c$  – измеренные штангенциркулем размеры опухоли в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Объемы опухолей усреднялись для животных каждой группы.

Для количественной оценки противоопухолевого эффекта были использованы следующие параметры:

*Коэффициент торможения роста опухоли* (ТРО %), рассчитываемый по формуле:

$$\text{ТРО \%} = (V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}) / V_{\text{контроль}} \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где:  $V_{\text{контроль}}$  – средний объем опухоли в контрольной группе,  $V_{\text{опыт}}$  – средний объем опухоли в опытной группе.

*Время задержки роста опухоли* (ВЗРО), вычисляемое по формуле:

$$\text{ВЗРО} = T_{\text{опыт}} - T_{\text{контроль}}, \quad (3)$$

где  $T_{\text{опыт}}$ ,  $T_{\text{контроль}}$  – время, за которое средний объем опухолей в контрольной и опытной группе достигает значения 1000 мм<sup>3</sup>.

*Логарифм числа погибших клеток* (lgN), вычисляемый по формуле:

$$\lg N = (\text{ВЗРО} \cdot 0,301) / \text{ВУ}, \quad (4)$$

где ВЗРО – время задержки роста опухоли, описанное выше, ВУ – время удвоения объема опухоли.

*Индекс роста* (ИР), определяемый как

$$\text{ИР} = S_{\text{опыт}} / S_{\text{контроль}}, \quad (5)$$

где  $S_{\text{опыт}}$ ,  $S_{\text{контроль}}$  – площади под кинетическими кривыми роста опухоли в опытной и контрольной группах соответственно [10].

### Результаты

Кинетические кривые среднего значения объема опухолей для всех четырех групп приведены на рис. 2.

Так как значения ТРО % и ИР зависят от временного параметра, для которого они рассчитаны (временная точка с момента облучения), были рассмотрены зависимости значений данных параметров от времени, прошедшего с момента облучения (рис. 3).

Из построенных зависимостей видно, что значения параметров ТРО% и ИР стабилизируются после 7–8 сут. Для построения зависимо-

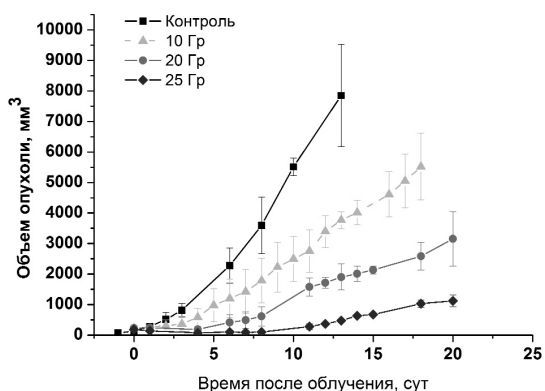


Рис. 2. Кинетические кривые изменения среднего объема опухолей в контрольной группе (■) и в группах, облученных в дозах 10 Гр (▲), 20 Гр (●) и 25 Гр (◆)

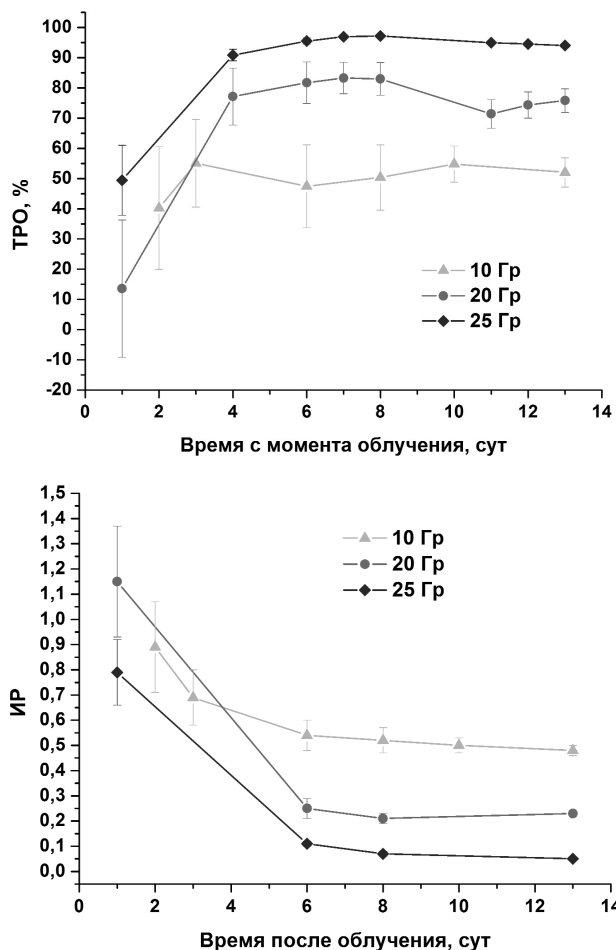


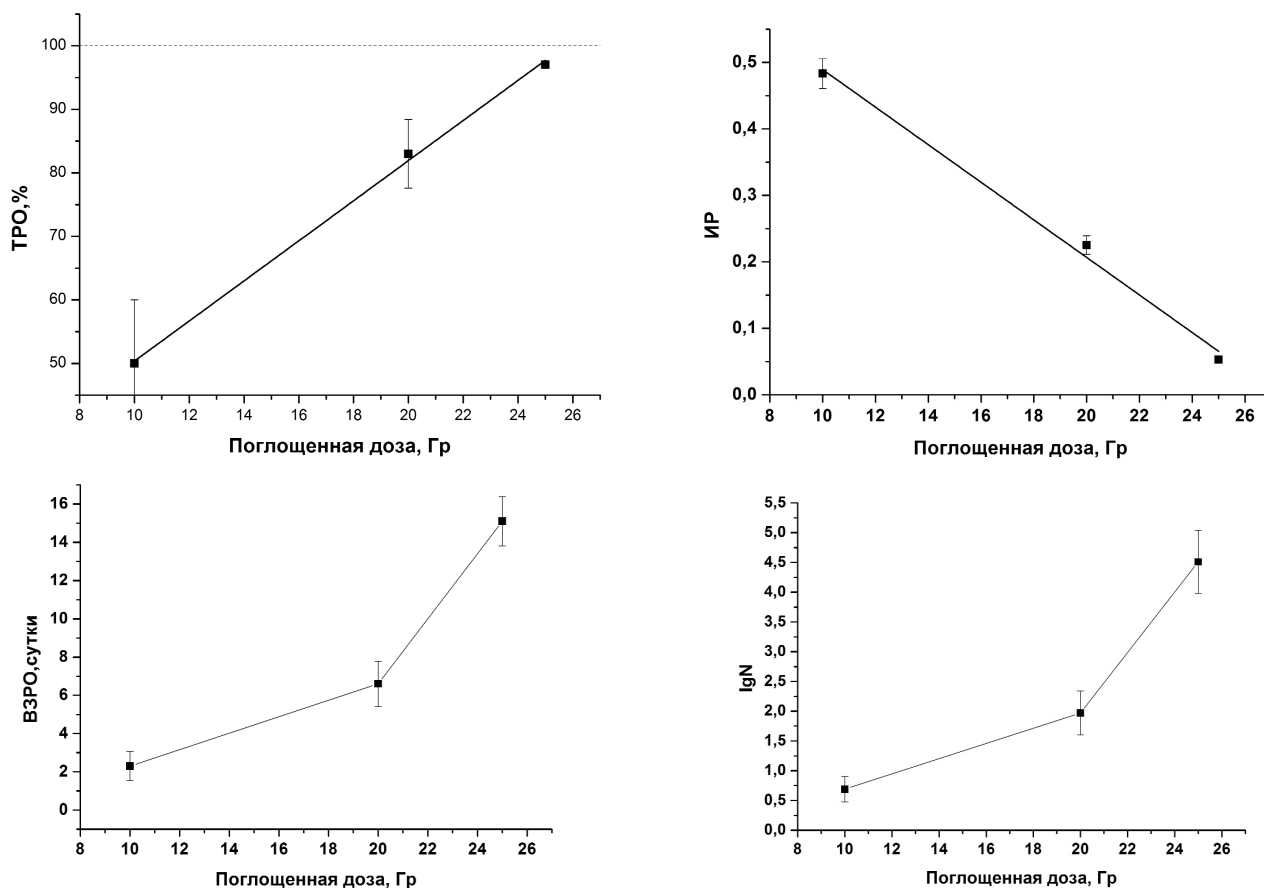
Рис. 3. Графики зависимости значений TPO % (а) и IP (б) для аденокарциномы молочной железы Ca755 от времени после облучения

сти данных параметров от величины поглощенной дозы TPO % рассчитывался для 7 сут, а IP – для 13 сут. Зависимость рассматриваемых параметров от величины поглощенной дозы приведены на рис. 4.

Из приведенных графиков видно, что ВЗРО и IgN имеют нелинейный характер зависимости от поглощенной дозы. Для определения характера зависимости требуется получение дополнительных экспериментальных точек с шагом не более 1,5–2 Гр. Сложность определения аналитической зависимости данных параметров от поглощенной дозы затрудняет их использование для расчета изоэффективной величины поглощенной дозы при исследовании дозоповышающих агентов и радиосенсибилизаторов. Напротив, TPO % и IP имеют выраженную линейную зависимость от поглощенной дозы с  $R^2 > 0,99$  на всем диапазоне поглощенных доз, обеспечивающих достоверное торможение роста опухоли. Принимая во внимание, что по определению TPO % не может быть больше 100 %, а IP – меньше 0, очевидно, что в области доз, способных обеспечивать полную регрессию опухоли (для исследованной опухолевой модели >25 Гр), характер зависимости параметров TPO% и IP будет отличаться от линейного и асимптотически приближаться к значениям 100 % и 0 соответственно. Однако данный диапазон доз является неинформативным при исследованиях терапевтической эффективности новых лучевых технологий, так как небольшое изменение значения противоопухолевого параметра будет соответствовать значительному изменению биологически эквивалентной дозы. В связи с этим методически более правильно снижать поглощенную дозы в группе с контрольным облучением, чтобы противоопухолевый эффект не выходил за границы линейности данных противоопухолевых параметров.

### Заключение

Было проведено исследование зависимости четырех основных количественных параметров оценки противоопухолевого эффекта от величины поглощенной дозы в опухоли: двух статических, вычисляемых по значениям объема опухоли в контрольной и опытной группах на определенный момент времени, и двух кинетических, вычисляемых по разнице скорости роста опухолей в контрольной и опытной груп-



**Рис. 4.** Графики зависимости ТРО % (а), ИР (б), ВЗРО (в) и IgN (г) для аденокарциномы молочной железы Ca755 от величины поглощенной дозы рентгеновского излучения

пах. Установлено, что зависимость статических параметров противоопухолевого эффекта (ТРО % и ИР) от величины поглощенной дозы на опухоль может быть описана линейной функцией в диапазоне значений поглощенной дозы, обеспечивающих торможение роста опухоли от минимального (+) до максимального (++++) по общепринятой шкале [8, 9]. Это позволяет легко определять эквивалентную по противоопухолевому эффекту дозу контрольного вида излучения для вычисления фактора повышения поглощенной дозы или фактора изменения поглощенной дозы исследуемого препарата или технологии. Кинетические параметры противоопухолевого эффекта, хоть и являются более точными по сравнению со статическими, однако их зависимость от поглощенной дозы носит нелинейный характер, что усложняет поиск аналитического вида данных зависимостей и требует дополнительного набора экспериментальных данных. Являясь интегральной характеристикой объема опухолевого узла за все вре-

мя наблюдения, ИР менее подвержен статистическим флуктуациям объема в опытных и контрольных группах, и поэтому является более достоверным параметром для оценки противоопухолевой эффективности новых лучевых технологий лечения злокачественных новообразований.

### Список литературы

1. Шейно И.Н., Ижевский П.В., Липенгольц А.А. и соавт. Разработка бинарных технологий лучевой терапии злокачественных новообразований: состояние и проблемы // Бюллетень сибирской медицины. 2017. Т. 16. № 3. С. 192–209.
2. Кулаков В.Н., Липенгольц А.А., Григорьева Е.Ю., Шимановский Н.Л. Противоопухолевая эффективность фотонно-захватной терапии // Онкологический журнал: лучевая

- диагностика, лучевая терапия. 2018. Т. 1. № 4. С. 82–91.
3. Липенгольц А.А., Григорьева Е.Ю., Иванов С.М. и соавт. Современное состояние клинической нейтрон-захватной терапии // Онкологический журнал: лучевая диагностика, лучевая терапия. 2018. Т. 1. № 1. С. 15–18.
  4. Zhang X., Huo L., Jin H. et al. Anti-cancer activity of Annexin V in murine melanoma model by suppressing tumor angiogenesis // *Oncotarget*. 2017. Vol. 26. № 8. P. 42602–42612.
  5. Luo R., Niu L., Qiu F., et al. Monitoring apoptosis of breast cancer xenograft after paclitaxel treatment with  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled duramycin SPECT/CT // *Molecular Imaging*. 2016. Vol. 15. P. 1–10.
  6. Elvas F., Boddaert J., Vangestel C. et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -duramycin SPECT imaging of early tumor response to targeted therapy: a comparison with  $^{18}\text{F}$ -FDG PET // *J. Nucl. Med.* 2017. Vol. 58. № 4. P. 665–670.
  7. Rapic S., Vangestel C., Elvas F., et al. Evaluation of [ $^{18}\text{F}$ ]CP18 as a substrate-based apoptosis imaging agent for the assessment of early treatment response in oncology // *Molecular Imaging and Biology*. 2017. Vol. 19. № 4. P. 560–569.
  8. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н. и соавт. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
  9. Teicher B.A., Andrews P.A. *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials and Approval*. – New Jersey: Humana Press. 2004.
  10. Вершинина С.Ф., Стуков А.Н. *Справочник по экспериментальной терапии опухолей*. – СПб.: Репринт, 2008. 36 с.

#### METHODS OF ASSESSING THERAPEUTIC EFFICACY OF NEW RADIATION THERAPY TECHNOLOGIES

A.A. Lipengolts<sup>1,2,3</sup>, E.V. Kalashnikova<sup>3</sup>, V.A. Skribitsky<sup>3</sup>, T.K. Lobzhanidze<sup>4</sup>, A.V. Smirnova<sup>1</sup>, V.V. Vasileva<sup>3</sup>, E.S. Vorobyeva<sup>2</sup>, E.Yu. Grigorieva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

<sup>3</sup> National Research Nuclear University “MEPhI”, Moscow, Russia

<sup>4</sup> JSC “Scientific Research Institute of Technical Physics and Automation”, Moscow, Russia

Dependences of four most widely used endpoints for tumor suppression assessment (namely tumor growth suppression ratio, growth index, tumor growth delay and tumor cell kill logarithm) from x-ray absorbed dose were studied. The study was performed for three absorbed dose values (10, 20 and 25 Gy), which provide tumor suppression from low (+) to very high grade (++++). Irradiation was performed with 225 kVp x-ray machine. It was determined that in the range of studied absorbed dose values tumor growth delay and tumor kill cells logarithm endpoints have nonlinear dependences from absorbed dose. At the same time tumor growth suppression ratio and tumor growth index can be described with linear function ( $R^2=0.99$ ).

Key words: radiation therapy, tumor suppression, in vivo, laboratory animals, adenocarcinoma Ca755, tumor growth suppression ratio, tumor growth index, X-rays

E-mail: lipengolts@mail.ru