

УДК 577.3:599.323.4

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕЙТРОННОГО И ПРОТОННОГО ИЗЛУЧЕНИЙ НА РОСТ СОЛИДНОЙ ФОРМЫ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА И ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ У МЫШЕЙ

© 2021 г. Член-корреспондент РАН В. Е. Балакин^{1,*}, О. М. Розанова², Е. Н. Смирнова², Т. А. Белякова¹, А. Е. Шемяков^{1,2}, Н. С. Стрельникова¹

Поступило 28.01.2021 г.

После доработки 13.02.2021 г.

Принято к публикации 15.02.2021 г.

Изучено комбинированное действие двукратного облучения тонким сканирующим пучком протонов (ТСПП) в суммарной дозе 80 Гр и нейтронного излучения в дозе 5 Гр на рост солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и его отдаленные последствия у мышей-опухоленосителей. Обнаружено, что комбинированное облучение мышей нейтронами как до, так и после облучения ТСПП эффективно подавляло рост солидной АКЭ в течение месяца после воздействия. По частоте и тяжести лучевых поражений кожи, наблюдаемых у мышей через 15–40 сут, облучение нейтронами после ТСПП приводило к значительному улучшению этих показателей по сравнению с облучением только ТСПП, а облучение нейтронами до ТСПП оказалось более повреждающим, чем в других вариантах. Показано, что частота рецидивирования опухолей у мышей при комбинированном облучении значительно выше, а общая продолжительность жизни ниже по сравнению с мышами, облученными только ТСПП.

Ключевые слова: нейтронное излучение, тонкий сканирующий пучок протонов, гипофракционирование, асцитная карцинома Эрлиха, рецидивные опухоли, мыши

DOI: 10.31857/S2686738921030033

В настоящее время в мире протонная терапия (ПТ) успешно используется для лечения наиболее распространенных и сложных видов рака, особенно опухолей головного мозга и в педиатрии [1, 2]. Для дальнейшего развития ПТ разрабатываются методы и подходы усиления действия протонного излучения с помощью FLASH-терапии [3] наноэхансеров [4], использования схем гипофракционирования [5, 6] и сочетанного действия с другими видами излучений, обладающими синергетическими или аддитивными свойствами [7]. Наиболее современной в ПТ является технология тонкого сканирующего пучка протонов (ТСПП), которая позволяет с большой точностью облучать опухоли и значительно снижать нагрузку на окружающие здоровые ткани. В по-

следние годы сформировалось представление о сложном клеточном строении злокачественных образований и присутствия в них опухолевых стволовых клеток (ОСК), обладающих способностью формировать опухоль и поддерживать ее рост. Многие факты указывают на то, что именно ОСК отвечают за радиорезистентность агрессивных опухолей и возникновение рецидивов после радиотерапии [8]. Излучения с высокими значениями линейной потери энергии, к которым относятся протоны, ионы углерода и нейтроны, способны преодолеть радиорезистентность ОСК за счет индукции в них нерепарируемых повреждений ДНК [9], что делает лечение злокачественных новообразований эффективным не только за счет подавления роста первичной опухоли, но и снижения частоты рецидивирования. В работах [10, 11] выявлена высокая эффективность нейтронов при лечении радиорезистентных и распространенных видов опухолей. В работе [12] по клоногенной активности клеток меланомы В-16 показано, что предварительное облучение нейтронами может усиливать действие фотонного излучения аддитивно или синергетически, а эффект зависит от соотношения доли нейтронов в суммарной дозе облучения.

¹ Физико-технический центр Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Протвино, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццо, Россия

*e-mail: balakin@ftcfian.ru

Ранее нами было высказано предположение, что появление рецидивных опухолей асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей после гипофракционированного облучения ТСПП в дозах 30 + 30 Гр и 40 + 40 Гр происходит за счет сохранения единичных, наиболее радиоустойчивых ОСК [13]. Поскольку существует достаточно экспериментальных доказательств о роли ОСК в развитии отсроченных вторичных опухолей как на месте первичной, так и в другой локализации [14], то для повышения эффективности ПТ необходимо усиление воздействия на ОСК и снижение частоты рецидивирования.

Целью настоящей работы было исследование сочетанного действия двукратного облучения тонким сканирующим пучком протонов (ТСПП) в суммарной дозе 80 Гр и нейтронного излучения в дозе 5 Гр на рост солидной формы АКЭ и его отдаленные последствия (продолжительность ремиссии, частота рецидивов, лучевые реакции кожи, средняя продолжительность жизни (СПЖ)) у мышей-опухоленосителей.

Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах мышей колонии SHK с массой тела 24–28 г, которых содержали в стандартных условиях вивария [15]. Для индукции солидной АКЭ мышам внутримышечно вводили 2×10^6 клеток в бедро левой задней лапы. Мыши с перевитыми опухолями были разделены на 4 группы по 15 животных: 1 – ТСПП двумя фракциями по 40 Гр через 24 ч; 2 – 5 Гр нейтронов + через 3 ч ТСПП двумя фракциями по 40 Гр через 24 ч; 3 – ТСПП двумя фракциями по 40 Гр через 24 ч + 5 Гр нейтронов через 3 ч после второй фракции протонов; 4 – контрольная, необлученные мыши с опухолями, подвергшиеся транспортировке к источникам излучений, анестезии и имитации условий облучения. Доза облучения нейтронами 5 Гр была выбрана с учетом величины относительной биологической эффективности (ОБЭ) непрерывных нейтронов на мышах и расчета доли нейтронов в суммарной дозе облучения около 15% для получения синергетического или аддитивного эффектов.

Локальное облучение мышей проводили на 5-й день после инокуляции АКЭ, когда опухолевый узел пальпировался у всех животных. Перед облучением мышей анестезировали ксилазин/золегилом. В качестве источника ТСПП использовали протонный синхротрон (Комплекс ПТ “Прометеус”, ФТЦ ФИАН, Протвино). Мышей индивидуально фиксировали на наклонной платформе в водном фантоме. Для установления объема облучения проводили конусно-лучевую компьютерную томографию мышей на встроенном в комплекс томографе и определяли объем опухоли у каждой мыши в специально разработанной трехмерной планирующей системе. Средний объ-

ем опухоли составил 0.45 ± 0.025 см³. Расчет дозы в заданном объеме проводили в программе планирования облучения, основанной на методе Монте-Карло с итеративной динамической оптимизацией по соотношению min/max дозы. Облучение опухоли проводили импульсно (длительность импульса 200 мс, 1 импульс в 2 с) с двух противоположных направлений, энергия протонов на выходе 96–104 МэВ, сигма пучка на входе в фантом 2.8–3.6 мм. Погрешность поглощенной дозы протонов составляла около 5%.

Источником нейтронов служил портативный нейтронный генератор непрерывного действия НГ-14 (МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ “НМИРЦ” Минздрава России, Обнинск) с энергией нейтронов 14.1 МэВ. Для локального облучения мышей фиксировали на платформе таким образом, чтобы область опухоли находилась в поле облучения нейтронами. Погрешность определения поглощенной дозы составляла 12–15%.

После облучения у животных регистрировали динамику роста АКЭ, лучевые реакции кожи, длительность ремиссии, частоту рецидивов АКЭ, СПЖ мышей-опухоленосителей. Динамику роста АКЭ определяли по объему опухоли дважды в неделю в течение месяца. Лучевые реакции кожи наблюдали согласно клинико-морфологической классификации Радиотерапевтической онкологической группы и Европейской организации по исследованию и лечению рака RTOG/EORTC-95 [16]. Статистическую оценку различий между группами, имеющими нормальное распределение, проводили с помощью t-критерия Стьюдента; в остальных случаях использовался непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для сравнения результатов эксперимента, где показатели выражались в долях, достоверность различий оценивали по критерию углового преобразования Фишера.

На рис. 1 показаны кривые роста АКЭ у мышей после облучения. При всех вариантах лучевого воздействия наблюдалось полное подавление роста первичной опухоли у мышей в течение месяца.

Ранее нами была показана высокая эффективность подавления роста опухолей у мышей при гипофракционированном облучении ТСПП в дозах 60 и 80 Гр [6]. И по критерию подавления роста АКЭ мы не могли ожидать модификации эффекта при комбинированном воздействии с нейтронами. Используемая нами модель тестирования новых схем радиотерапии позволяла на фоне подавления первичной опухоли в этом же временном периоде оценить кожные лучевые реакции, частота и тяжесть проявления которых влияют на общее состояние мышей-опухоленосителей в период ремиссии и могут участвовать в развитии более отдаленных последствий (время

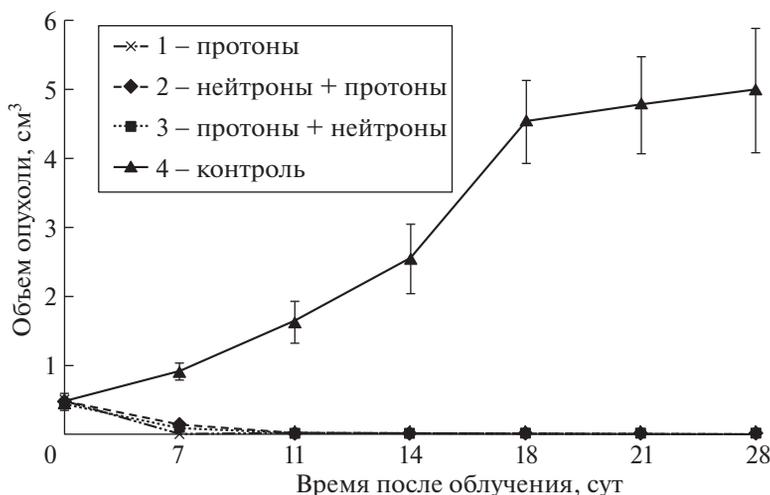


Рис. 1. Динамика роста АКЭ у мышей после облучения пучком протонов 40 + 40 Гр и их сочетанного воздействия с нейтронами в дозе 5 Гр. Данные представлены как среднее значение \pm SD. $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем.

появления рецидива, частоту рецидивов, продолжительность жизни).

У мышей оценивали тяжесть и течение лучевых поражений кожи в области облучения. Время латентного периода развития повреждений для всех групп было 10–12 сут. Во 2-й группе кожные реакции на 13-е сутки наблюдались у 100% мышей, в 1-й группе — у 70.8%, а в 3-й только у 43% мышей. Период проявления выраженных лучевых поражений кожи составлял 5–7 сут для всех групп, однако тяжесть кожных реакций была различна: во 2-й группе самая тяжелая 4-я степень поражений, характеризующаяся появлением язв и некрозов, наблюдалась у 87.5%, в 1-й группе — у 46%, а в 3-й только у 14% мышей. Кроме того, в 3-й группе, где наблюдали самую низкую частоту общего количества кожных реакций, у 29% мышей лучевые поражения не развивались более 1-й степени (умеренная эритема, эпиляция, сухой эпидермит). Различия по частоте встречаемости и тяжести протекания лучевых поражений между группами были статистически значимы ($p < 0.05$). В 3-й группе наблюдалась самая благополучная картина лучевых последствий: низкая доля мышей с поражениями кожи, большая часть которых была небольшой степени выраженности. По нескольким критериям повреждений кожи показано, что предварительное облучение нейтронами в дозе 5 Гр перед гипофракционированным ТСПП значительно усиливает эту категорию побочных последствий, что приводит к дополнительной интоксикации мышей, связанной с острым и хроническим воспалением, и может влиять на более отдаленные последствия.

Средняя продолжительность безрецидивного периода в 1-й группе составила 85 сут, а в группах с сочетанным воздействием срок ремиссии был

ниже и составлял 43 и 60 сут. СПЖ мышей без рецидивов в группах с сочетанным воздействием была меньше (118 и 124 сут) по сравнению с группой мышей, облученных только протонами (278 сут). Первые рецидивные опухоли у мышей во всех группах появлялись примерно через 35–45 сут после облучения, однако динамика гибели мышей с рецидивами в группах сочетанного воздействия резко отличалась: мыши гибли в течение следующих 2–3 мес по сравнению с группой, облученной только ТСПП, в которой этот период составил 10 мес (рис. 2).

На рис. 3 представлены кривые выживаемости мышей без рецидивов, выявлено, что в группах после сочетанного воздействия животные гибли значительно быстрее, чем при облучении только протонами, и максимальная продолжительность жизни во 2-й группе составила 7 мес, в 3-й группе — 11 мес, а в 1-й — 21 мес.

Таким образом, по критериям длительности ремиссии, частоты рецидивов и продолжительности жизни мышей-опухоленосителей показано, что дополнительное воздействие нейтронов как до, так и после гипофракционированного облучения ТСПП значительно ухудшает эти показатели эффективности терапии. Известно, что облучение опухолей такими частицами с высокой ЛПЭ, как нейтроны и ионы углерода, вызывает значительные радиационные повреждения в клетках, окружающих опухоль [17]. Ранее нами было показано при гипофракционированном облучении ТСПП разных объемов АКЭ, что облучение точного пальпируемого размера опухоли приводит к меньшей частоте рецидивирования у мышей по сравнению с объемом опухоли, который также рекомендован в клинической практике, но захватывает окружающие ткани с учетом

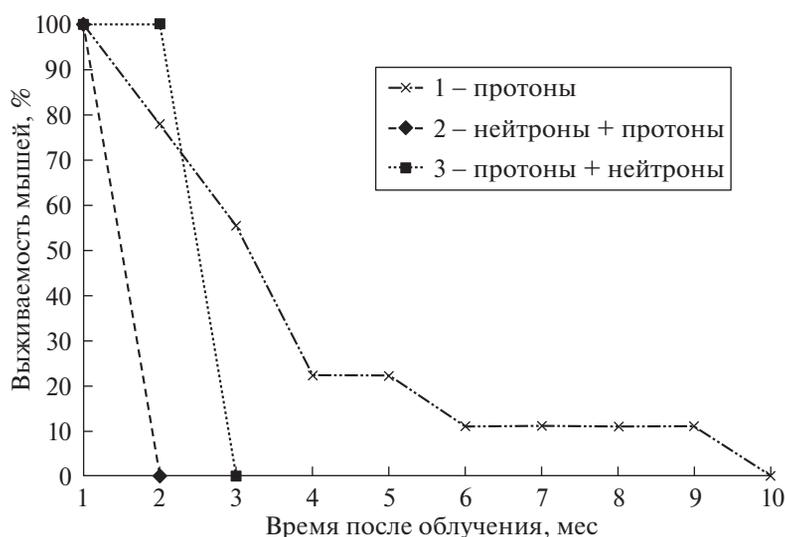


Рис. 2. Динамика гибели мышей с рецидивами после облучения протонами 40 + 40 Гр и их сочетанного воздействия с нейтронами в дозе 5 Гр.

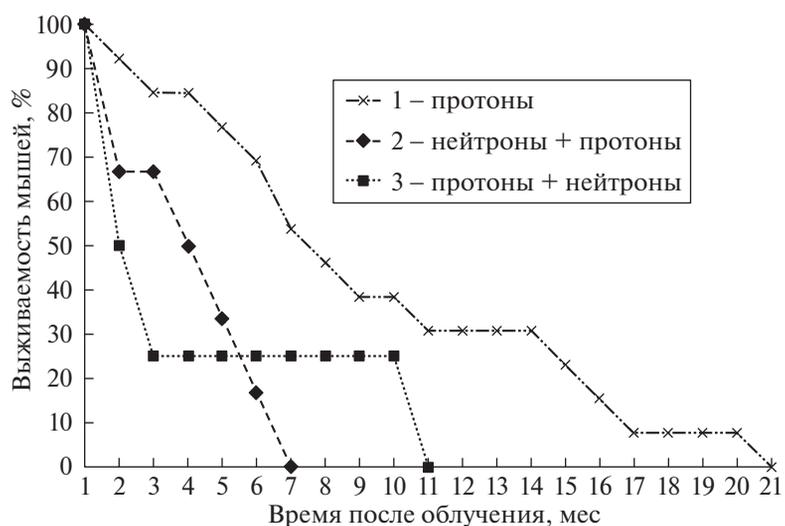


Рис. 3. Динамика гибели мышей без рецидивов после облучения протонами 40 + 40 Гр и их сочетанного воздействия с нейтронами в дозе 5 Гр.

сложных размеров опухоли, ее локализации или дыхания пациента [13]. В нашей работе, при облучении нейтронами в дозе 5 Гр был облучен большой объем здоровой ткани, находящийся за опухолью, что могло негативно сказаться на частоте рецидивирования опухоли и выживаемости мышей. Локальное облучение нейтронами опухоли в области бедренной кости мыши, в костном мозге которой находится в 7–8 раз больше миеелокариоцитов, чем в голени или предплечье, видимо, дополнительно угнетает кроветворение, что приводит к сокращению продолжительности жизни в группах после сочетанного облучения. Кроме того, возможно, эти эффекты обусловлены способ-

ностью нейтронов к прогрессирующему увеличению ОБЭ, обратно пропорциональному дозе, при котором падение дозы с расстоянием вдоль пучка нейтронов сопровождается более высокими значениями ОБЭ в нормальных тканях за пределами мишени [11].

Таким образом, в нашей работе было показано, что комбинированное облучение мышей нейтронами в дозе 5 Гр как до, так и после двукратного облучения ТСПП, эффективно подавляло рост солидной АКЭ в течение месяца после воздействия. По частоте и тяжести лучевых поражений кожи, наблюдаемых через 15–40 сут после терапии, облучение нейтронами после ТСПП приво-

дило к значительному улучшению этих показателей по сравнению с ТСПП, однако облучение нейтронами перед ТСПП оказалось более повреждающим, чем в других вариантах. В отдаленные сроки после комбинированного облучения у мышей-опухоленосителей было выявлено значительное ухудшение таких показателей, как частота рецидивирования и СПЖ. Значение последовательности воздействия излучений с разной ЛПЭ на индукцию биологических эффектов при сочетанном облучении также показано в работе по исследованию действия протонов и ионов углерода на выживаемость опухолевых клеток в культуре [18]. В работе [19] при сочетанном действии равных доз гамма-излучения и протонов (32 Гр) по критериям индукции патологических митозов, апоптотической гибели опухолевых клеток и снижения их пролиферативной активности показано усиление действия ТСПП.

Полученные в нашей работе результаты на модели контроля опухолевого роста АКЭ у мышей показывают, что регистрация как краткосрочных, так и отдаленных последствий, позволяет более полно оценить эффективность схем облучения, выявить разнонаправленный характер проявления реакций, системно подойти к преимуществам и недостаткам метода при выборе лечения опухоли в зависимости от локализации, размера, формы, близости к критическим органам, а также учесть возможный вклад лучевых повреждений кожи при выборе стратегии терапии. Используемый подход оценки противоопухолевой эффективности сочетанного действия излучений на животных может быть полезным для отработки новых схем лучевой терапии, расширения спектра клинических показаний и совершенствования ПТ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по исследованию комбинированного действия нейтронного и протонного излучения на рост солидной формы асцитной карциномы Эрлиха и отдаленные последствия у мышей выполнена на базе ФТЦ ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева и ФГБУН ИТЭБ РАН в рамках выполнения фундаментальных научных исследований по темам ГЗ при частичной финансовой поддержке договора НИР № 01/16 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования

животных при выполнении работы были соблюдены. Исследования проводили в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (Federation of European laboratory animal science association, FELASA).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.А. Лычагину, С.Н. Корякину, Т.С. Хозяшевой – сотрудникам отдела радиационной биофизики МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России, Обнинск за помощь в организации и проведении эксперимента по облучению нейтронами на оборудовании Центра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blanchard P., Gunn G., Lin A., Foote R.L., et al.* Proton Therapy for Head and Neck Cancers // *Semin. Radiat. Oncol.* 2018. V. 28. № 1. P. 53–63.
2. *Baliga S., Gandola L., Timmermann B., et al.* Brain tumors: Medulloblastoma, ATRT, ependymoma // *Pediatr. Blood Cancer.* 2020. May 9.
3. *Diffenderfer E., Verginadis I., Kim M., et al.* Design, Implementation, and in Vivo Validation of a Novel Proton FLASH Radiation Therapy System // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2020. V. 106. № 2. P. 440–448.
4. *Liu Y., Zhang P., Li F., et al.* Metal-based NanoEnhancers for Future Radiotherapy: Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells // *Theranostics.* 2018. V. 8. № 7. P. 1824–1849.
5. *Балакин В.Е., Шемяков А.Е., Заичкина С.И. и др.* Гипофракционированное облучение солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей тонким сканирующим пучком протонов // *Биофизика.* 2016. Т. 61. № 4. С. 808–812.
6. *Балакин В.Е., Заичкина С.И., Розанова О.М. и др.* Протонное облучение мышей с асцитной карциномой Эрлиха // *Медицинская физика.* 2018. № 3. С. 24–30.
7. *Ghaffari H., Beik J., Talebi A., et al.* New physical approaches to treat cancer stem cells: a review // *Clin. Transl. Oncol.* 2018. V. 20. № 12. P. 1502–1521.
8. *Li J., Fan W., Wang M., et al.* Effects of mesenchymal stem cells on solid tumor metastasis in experimental cancer models: a systematic review and meta-analysis // *J. Transl. Med.* 2018. V. 16. № 113.
9. *Chiblak S., Tang Z., Campos B., et al.* Radiosensitivity of Patient-Derived Glioma Stem Cell 3-Dimensional Cultures to Photon, Proton, and Carbon Irradiation // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2016. V. 95. № 1. P. 112–119.
10. *Гулидов И.А., Мардынский Ю.С., Цыб А.Ф. и др.* Нейтроны ядерных реакторов в лечении злокачественных новообразований. Обнинск: МРНЦ РАН, 2001.
11. *Jones B.* Clinical Radiobiology of Fast Neutron Therapy: What Was Learnt? // *Front. Oncol.* 2020. V. 10. № 1537.

12. Бекетов Е.Е., Исаева Е.В., Корякин С.Н. Зависимость эффективности одновременного воздействия гамма-квантов и нейтронов с энергией 14 МэВ от вклада плутонизирующего компонента // Радиация и риск. 2012. Т. 21. № 3. С. 82–90.
13. Балакин В.Е., Шемяков А.Е., Заичкина С.И., и др. Отдаленные лучевые последствия после гипофракционированного облучения протонами солидной карциномы Эрлиха у мышей // Биофизика. 2017. Т. 62. № 1. С. 161–167.
14. Peitzsch C., Tyutyunnykova A., Pantel K., et al. Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases // Semin. Cancer Biol. 2017. V. 44. P. 10–24.
15. Smith J., van den Broek F., Martorell J., 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. V. 41. № 2. P. 143–160.
16. Cox J., Stetz J., Pajak T. Toxicity criteria of the RTOG and EORTC // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1995. V. 31. № 5. P. 1341–1346.
17. Стрелин Г.С., Шмидт Н.К., Сильченко Н.Н., и др. Эффект экранирования части костного мозга при фракционированном облучении организма. Л: Медицина, 1978.
18. Troshina M., Koryakina E., Potetnya V., et al. The effect of combined proton and carbon ion irradiation on Chinese hamster B14-150 cells. In: Book of Abstracts. Eighth international conference on radiation in various fields of research; Virtual conference. 2020. P. 126.
19. Южаков В.В., Корчагина К.С., Фомина Н.К., и др. Действие G-излучения и сканирующего пучка протонов на морфофункциональные характеристики саркомы М-1 крыс // Радиация и риск. 2020. Т. 29. № 2. С. 101–114.

COMBINED EFFECT OF NEUTRON AND PROTON RADIATIONS ON THE GROWTH OF SOLID EHRlich ASCITES CARCINOMA AND REMOTE EFFECTS IN MICE SOILS

Corresponding Member of the RAS V. E. Balakin^{a,#}, O. M. Rozanova^b, E. N. Smirnova^b,
T. A. Belyakova^a, A. E. Shemyakov^{a,b}, and N. I. Strelnikova^a

^a Physical Technical Center, P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences, Protvino, Russian Federation

^b Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

[#]e-mail: balakin@ftcfian.ru

The combined effect of the irradiation with a pencil beam scanning of protons (PBSP) at a total dose of 80 Gy and neutron radiation at a dose of 5 Gy on the growth of solid Ehrlich ascites carcinoma (EAC) and the remote effects in tumor-bearing mice has been studied. Combined irradiation of mice with neutrons before and after irradiation with PBSP, as well as irradiation only with PBSP, effectively suppressed the growth of solid EAC within one month. In terms of the frequency and severity of radiation-induced skin reactions of mice observed 15–40 days after therapy, neutron irradiation after the irradiation with PBSP showed better values of these parameters compared to only PBSP, however, exposure to neutrons before PBSP was more damaging compared to the other two options. It was also shown that the tumor relapse rate in the groups of animals with combined irradiation was higher, and the total lifespan was lower than the group of mice irradiation only PBSP.

Keywords: neutron radiation, pencil beam scanning of protons, hypofractionation, Ehrlich ascites carcinoma, tumor relapses, mice