

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛИ СОЛИДНОЙ ФОРМЫ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РАННИХ И ОТДАЛЁННЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ ГИПОФРАКЦИОНИРОВАННОГО ПРОТОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ

В.Е. Балакин¹, Т.А. Белякова^{1,*}, О.М. Розанова², Е.Н. Смирнова², А.Е. Шемяков^{1,2},
Н.С. Стрельникова¹

¹ Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН
142281, Российская Федерация, Московская обл., Протвино, Академический пр., 2

² ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 3

Исследовано действие тонкого сканирующего пучка протонов в дозах 60 и 80 Гр на солидную форму асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей. Показано, что мыши с индуцированной АКЭ являются удобной моделью для исследования схем гипофракционирования при протонной терапии.

Ключевые слова: нелинейные мыши SHK, асцитная карцинома Эрлиха, протоны

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Балакин В.Е., Белякова Т.А., Розанова О.М., Смирнова Е.Н., Шемяков А.Е., Стрельникова Н.С. Использование модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей для исследования ранних и отдалённых последствий гипофракционированного протонного облучения. *Биомедицина*. 2021;17(3E):127–132. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-127-132>

Поступила 14.04.2021

Принята после доработки 24.06.2021

Опубликована 20.10.2021

STUDY OF EARLY AND REMOTE EFFECTS OF HYPOFRACTIONATED PROTON IRRADIATION IN A MODEL OF SOLID EHRLICH ASCITES CARCINOMA IN MICE

Vladimir E. Balakin¹, Tatiana A. Belyakova^{1,*}, Olga M. Rozanova², Elena N. Smirnova²,
Alexander E. Shemyakov^{1,2}, Nataliia S. Strelnikova¹

¹ Branch "Physics and Technology Center" of the P.N. Lebedev Physical Institute
of the Russian Academy of Sciences
142281, Russian Federation, Moscow Region, Protvino, Akademicheskiiy Passage, 2

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya Str., 3

The effect of a pencil scanning beam of protons at doses of 60 and 80 Gy on the solid form of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) in mice was studied. It was shown that mice with induced EAC are a convenient model for studying hypofractionation schemes under proton therapy.

Keywords: non-inbred mice SHK, Ehrlich ascites carcinoma, protons

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Balakin V.E., Belyakova T.A., Rozanova O.M., Smirnova E.N., Shemyakov A.E., Strelnikova N.S. Study of Early And Remote Effects of Hypofractionated Proton Irradiation in a Model of Solid Ehr-

lich Ascites Carcinoma in Mice. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):127–132. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-127-132>

Submitted 14.04.2021

Revised 24.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

В мире с каждым годом растёт количество онкологических заболеваний, основным методом лечения которых является лучевая терапия. В последние годы появились новые способы лечения рака с использованием высокоэнергетических протонов и ускоренных ионов углерода, направленные на повышение эффективности облучения опухолей и снижения побочных эффектов в здоровых тканях. Наиболее перспективным и активно развивающимся направлением в ядерной медицине в нашей стране является протонная терапия (ПТ) с использованием технологии тонкого сканирующего пучка протонов (ТСПП). Применение ТСПП позволяет снизить интегральную лучевую нагрузку на тело пациента в сравнении с другими методами ПТ, а также с современными методами фотонной терапии, что значительно уменьшает риск осложнений и развития рецидивов [4]. Для более эффективного использования возможностей ТСПП и расширения областей его применения в радиотерапии опухолей необходимо разрабатывать принципиально новые схемы облучения, наиболее перспективным из которых является гиподифракционированное облучение, при котором за счёт увеличения однократной дозы сокращается время лечения. В связи с этим возникает проблема поиска удобных экспериментальных моделей опухолей у животных, позволяющих оценивать в зависимости от объёма облучаемой ткани, дозы одной фракции, интервала между фракциями и суммарной дозы облучения не только противоопухолевую эффективность и ранние лучевые последствия, но и наблюдать за рецидивами

и развитием других отдалённых реакций в течение всей жизни.

Модель аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) широко и достаточно давно используется на лабораторных мышах для исследования противоопухолевого действия различных видов излучений, наночастиц, при тестировании широкого спектра фармакологических и природных препаратов [2, 5]. Это агрессивная, быстрорастущая карцинома, солидная форма которой не метастазирует и не дифференцирована, что удобно для исследования. Силидную форму АКЭ можно перевивать в разные локализации на теле животного, существует возможность точного контроля облучаемого объёма опухоли, а также регистрации кожных лучевых реакций.

Ранее нами на этой модели опухоли на мышах было показано влияние облучаемого объёма опухоли АКЭ на противоопухолевую эффективность гиподифракционированного облучения протонами и отсутствие зависимости эффекта от времени между фракциями [1].

Целью работы являлось исследование действия ТСПП при гиподифракционированном облучении в дозах 60 и 80 Гр солидной формы АКЭ на мышах линии SHK.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах аутбредных нелинейных мышей колонии SHK массой тела 31–35 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, которых разводили и содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино, Россия), при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$, естественном световом

дне и свободным доступом к пище и воде [6]. Мыши содержались в полипропиленовых клетках по 10 особей. План экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биобезопасности и биоэтике. В качестве опухолевой модели была использована солидная форма АКЭ, клеточная линия которой получена из ФГБУН «РНЦ им. Н.Н. Блохина». Клетки АКЭ поддерживали *in vivo* в форме асцита у мышей SHK путём серийной внутрибрюшинной перевивки с интервалами 4–7 сут. Для индукции солидной АКЭ мышам внутримышечно вводили 2×10^6 клеток в бедро левой задней лапы. Затем животные были разделены на группы, которые облучались ТСПП в суммарных дозах 60 Гр и 80 Гр однократно или по схеме гипофракционирования двумя фракциями с интервалом 24 ч. Облучение мышей проводили на 5-й день после инокуляции АКЭ, когда опухолевый узел пальпировался у всех животных. Частота индукции опухоли составляла 100%. Для нахождения объёма облучаемой ткани получали томограммы мышей в водном фантоме с помощью компьютерного томографа с коническим пучком, интегрированного в ускоритель, определяли объём опухоли у каждой мыши и рассчитывали средний фактический объём опухоли, который составил $0,47 \pm 0,025$ см³. Поскольку нами было показано, что при гипофракционированном облучении ТСПП в суммарной дозе 60 Гр солидной формы АКЭ у мышей увеличение объёма облучаемой ткани не является необходимым для повышения эффективности лечения, а лучшие противоопухолевые показатели наблюдаются при облучении визуализируемого инструментально объёма опухоли [3], то в специально разработанной трёхмерной программе оконтуривания и согласно рекомендациям Международной комиссии по радиационным единицам МКРЕ-62 по выбору объёмов мишени при радиотерапии задавали макроскопический объём

опухоли, который в данной серии экспериментов равнялся $0,47$ см³.

Облучение осуществлялось на протонном синхротроне комплекса протонной лучевой терапии «Прометеус» (ФТЦ ФИАН, Протвино), который разрабатывается и эксплуатируется в рамках научно-исследовательского предприятия, что предоставляет возможность проведения физических и биологических экспериментов с применением технологии ТСПП. Мышей индивидуально фиксировали на платформе таким образом, чтобы облучаемая конечность была максимально удалена от тела, затем платформу наклонно погружали в водный фантом. Верификацию положения мыши при облучении производили с помощью лазерной системы позиционирования и съёмки проекций с совмещением текущего положения мишени с исходным с точностью 1 мм. Расчёт дозы в заданном объёме проводили в программе планирования облучения, основанной на методе Монте-Карло с итеративной динамической оптимизацией по соотношению \min/\max дозы. Погрешность поглощённой дозы протонов составляла около 5%.

После облучения следили за динамикой роста опухоли путём еженедельного измерения её размеров в течение месяца, и объём опухоли считали по формуле [7]: *объём опухоли* = $\pi/6 \times d_1 \times d_2 \times d_3$, где d — три ортогональных диаметра, а также регистрировали длительность ремиссии, частоту рецидивирования, динамику гибели мышей с рецидивами и продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

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

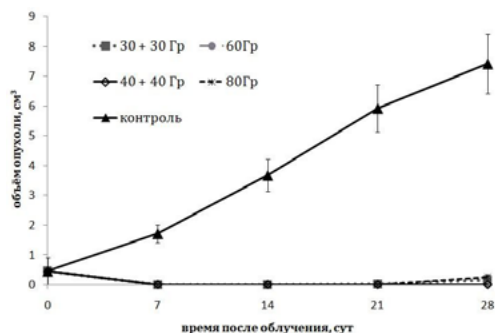


Рис. 1. Динамика роста АКЭ у мышей после облучения пучком протонов в суммарных дозах 60 и 80 Гр по сравнению с необлучёнными мышами-опухоленосителями.

Fig. 1. Dynamics of AKE growth in mice after irradiation with a proton beam at total doses of 60 and 80 Gy compared with non-irradiated tumor-bearing mice.

оценивали по критерию углового преобразования Фишера.

Результаты исследований

При сравнении противоопухолевой эффективности облучения ТСПП в дозах 60 и 80 Гр на скорость роста АКЭ в течение месяца различий выявлено не было как при фракционированном, так и при однократном облучении мышей (рис. 1). У большинства животных наблюдали полное подавление роста АКЭ.

Через 1 мес. после ПТ мы регистрировали отдалённые лучевые последствия у мышей с полной регрессией опухолевых узлов. К этому моменту в группе 30+30 Гр

наблюдали отсутствие опухоли у 77% мышей, в группе 80 Гр — у 80%, а в группах, облучённых в дозах 40+40 Гр и однократно 60 Гр, — у 100% животных. Во всех группах появление рецидивов начиналось на 35–40 сут. после облучения, но к концу 2-го мес. в группах при общей дозе облучения 60 Гр мышей с рецидивами было около 40%, в отличие от группы, облучённой в дозе 80 Гр, где их наблюдалось только 13%. У мышей, облучённых однократно в дозе 80 Гр, рецидивы появлялись быстрее, и уже к 5 мес. мыши с рецидивами погибали, а при фракционированном облучении 40+40 Гр развитие рецидивов происходило медленнее, чем в других вариантах, последний рецидив наблюдали через 8 мес., а общее количество рецидивов было на 20% меньше (табл.). Рецидивная опухоль возникала в той же конечности мыши и по структуре и динамике роста была аналогична первичной, что позволяет предположить развитие той же формы АКЭ [1, 3].

Средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей без рецидивов в группах с суммарной дозой 60 Гр составила 241 сут. при однократном воздействии и 262 сут. — при фракционированном облучении, а для групп 80 Гр — 270 сут. и 279 сут. соответственно.

На рис. 2 показаны кривые выживаемости мышей-опухоленосителей после ПТ. При всех схемах облучения значимых отличий

Таблица. Доля мышей с рецидивами в разные сроки после облучения тонким сканирующим пучком протонов мышей с АКЭ

Table. The proportion of mice with relapses at different times after irradiation of AKE mice with a pencil scanning proton beam

Условия облучения	Количество мышей с рецидивами, %							
	2 мес.	3 мес.	4 мес.	5 мес.	6 мес.	7 мес.	8 мес.	9 мес.
30+30 Гр	39	52	53	57	57			
60 Гр	40	40	50	60	60	60		
40+40 Гр	13	23*	27*	27*	27*	27*	30	30
80 Гр	12	50	50					

Примечание: * — различия статистически достоверны ($p < 0,05$).

Note: * — differences are statistically significant ($p < 0.05$).

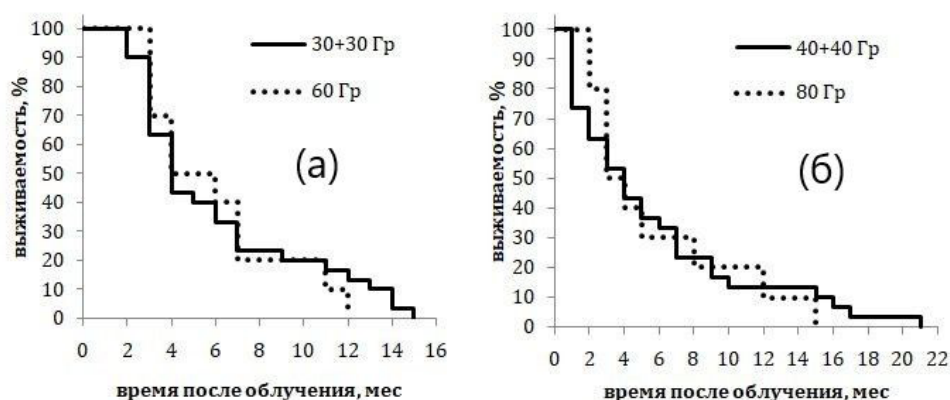


Рис. 2. Динамика выживаемости мышей-опухоленосителей после облучения тонким сканирующим пучком протонов в суммарной дозе 60 Гр (а) и 80 Гр (б).

Fig. 2. Dynamics of survival of tumor-bearing mice after irradiation with a pencil scanning proton beam at a total dose of (a) 60 Gy; (b) 80 Gy.

чий в динамике гибели животных не наблюдалось, но максимальная продолжительность жизни в группе 30+30 Гр составила 15 мес. по сравнению с однократным облучением в дозе 60 Гр, где все мыши погибли к 12 мес., а самая поздняя гибель животных наблюдалась в группе, облучённой 2 фракциями в дозе 40 Гр.

Заключение

Таким образом, при использовании ТСПП в экстремально высоких дозах для облучения солидной формы АКЭ у мышей показана высокая противоопухолевая эффективность в течение первого месяца, и СПЖ безрецидивных мышей была практически одинаковой во всех группах, однако облучение АКЭ у мышей по схеме 40+40 Гр оказалось намного эффективнее как по частоте рецидивирования опухоли, так и по влиянию на продолжительность жизни по сравнению с другими группами.

В настоящее время схемы ПТ опухолей в клиниках мало отличаются от традиционной радиотерапии с суммарной дозой облучения 40–60 Гр по 2 Гр за фракцию. Преимущества ТСПП с баллистической точностью выгрузки дозы в мишень без повреждения окружающей ткани позволяют увеличить дозу фракции в несколько раз и развить новые схемы лечения опухолей головы и шеи, устойчивых к фотонному излучению, и особенно больных с плоскоклеточным раком, что требует дальнейшего поиска и апробации адекватных экспериментальных моделей как опухолей, так и трансгенных и нокаутных животных. Результаты проведённых экспериментов на большой выборке животных демонстрируют, что использование солидной АКЭ на мышцах колонии SHK является удобной, стабильной, хорошо воспроизводимой моделью, которая может применяться для тестирования режимов гипофракционированного облучения протонами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. 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;61(4):808–812. [Balakin V.E., Shemyakov A.E., Zaichkina S.I., et al. Gipofrakcionirovannoe oblucheniye solidnoy formy ascitnoy karcinomy Erlixa u myshej tonkim skaniruyushhim puchkom protonov

- [Hypofractionated irradiation of the solid form of Ehrlich ascites carcinoma in mice by a thin scanning proton beam]. *Biophysics*. 2016;61(4):682–686. (In Russian)].
2. Abdel-Gawad E.I., Hassan A.I., Awwad S.A. Efficiency of calcium phosphate composite nanoparticles in targeting Ehrlich carcinoma cells transplanted in mice. *J. Adv. Res.* 2016;7(1):143–154. DOI: 10.1016/j.jare.2015.04.001.
 3. Belyakova T.A., Balakin V.E., Rozanova O.M., et al. The impact of target volumes of Ehrlich ascites carcinoma irradiated with a pencil scanning beam of protons at a total dose of 60 Gy on the tumor growth and remote effects in mice. In: *Eighth International Conference on radiation in various fields of research*. DOI: 10.21175/RadProc.2020.05.
 4. Durante M. Proton beam therapy in Europe: More centres need more research. *Br. J. Cancer*. 2019;120(8):777–778.
 5. Raj Kapoor B., Sankari M., Sumithra M., et al. Antitumor and cytotoxic effects of *Phyllanthus polyphyllus* on Ehrlich ascites carcinoma and human cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71(9):2177–2183. DOI: 10.1271/bbb.70149.
 6. 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;41(2):143–160.
 7. Sorensen B.S., Horsman M.R., Alsner J., et al. Relative biological effectiveness of carbon ions for tumor control, acute skin damage and late radiation-induced fibrosis in a mouse model. *Acta Oncol.* 2015;54(9):1623–1630. DOI: 10.3109/0284186X.2015.1069890.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Балакин Владимир Егорович, чл.-корр. РАН, д.ф.-м.н., Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН;
e-mail: balakin@ftcfian.ru

Белякова Татьяна Анатольевна*, Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН;
e-mail: belyakovata@lebedev.ru

Розанова Ольга Митрофановна, ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;
e-mail: rozanova.iteb@gmail.com

Смирнова Елена Николаевна, ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;
e-mail: smirnova.elena04@gmail.com

Шемяков Александр Евгеньевич, Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН; ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;
e-mail: alshemyakov@yandex.ru

Стрельникова Наталия Сергеевна, Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН;
e-mail: petunia21.02@mail.ru

Vladimir E. Balakin, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Phys.-Math.), Branch “Physics and Technology Center” of the P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: balakin@ftcfian.ru

Tatiana A. Belyakova*, Branch “Physics and Technology Center” of the P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: belyakovata@lebedev.ru

Olga M. Rozanova, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: rozanova.iteb@gmail.com

Elena N. Smirnova, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: smirnova.elena04@gmail.com

Alexander E. Shemyakov, Branch “Physics and Technology Center” of the P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences; Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: alshemyakov@yandex.ru

Nataliia S. Strelnikova, Branch “Physics and Technology Center” of the P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: petunia21.02@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author