

Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2018
УДК 615.849.1.036:616-006

Вопросы онкологии, 2018. Том 64, №5

*Е.Е. Бекетов, Е.В. Исаева, Н.В. Наседкина, Е.П. Малахов, О.Ю. Голованова,
Л.Н. Ульяновко, А.Е. Чернуха, В.О. Сабуров, О.Г. Лепилина, С.Е. Ульяновко*

Биологическая эффективность сканирующего пучка протонов терапевтического комплекса «Прометеус» МРНЦ им. А.Ф. Цыба в исследованиях на культуре клеток мышинной меланомы В-16

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Обнинск

В основе применения протонов для задач лучевой терапии лежит фиксированное общепринятое значение их относительной биологической эффективности, равное 1,1. Многочисленные исследования показали, что ОБЭ протонного излучения не является постоянной величиной и зависит от ряда факторов. Целью настоящего исследования было определение ОБЭ тонкого сканирующего протонного пучка в центре распределенного пика Брэгга в экспериментах на культуре клеток мышинной меланомы В-16. Суспензию клеток облучали в водном фантоме горизонтальным пучком протонов с трех направлений (0, 90 и 180°) в дозах от 2 до 8 Гр. Модуляция энергии протонного излучения составляла 47,5÷92,0 МэВ. ОБЭ протонов определяли по клоногенной активности клеток, при сравнении с гамма-квантами ⁶⁰Со. Для построения дозовых зависимостей использовали линейно-квадратичную модель. Полученные значения ОБЭ протонного излучения (ЛПЭ 3÷8 кэВ/мкм) отличались в большую сторону от общепринятого значения, и составило на уровне 10% выживаемости 1,5. Полученные результаты в целом совпадают с данными зарубежных авторов, выполненными на разных установках.

Ключевые слова: протонная терапия, сканирующий пучок, ОБЭ, клоногенная активность, меланома В-16, ЛПЭ

Физическим преимуществом протонов, важным с точки зрения лучевой терапии, является пространственное распределение дозы, доставляемой непосредственно в опухоль. Протоны, как и более тяжелые ионы, характеризуются увеличением потерь энергии при прохождении через биологическую ткань в конце пробега. Эта особенность приводит к специфическому распределению поглощенной дозы, известному как пик Брэгга. Положение данного пика зависит от энергии частиц. Таким образом, если в состав пуч-

ка протонов входят частицы с различными (но строго определенными) энергиями, становится возможным облучение заданного объема биологической ткани в одинаковой дозе за счет так называемого распределенного пика Брэгга (spread-out Bragg peak — SOBP). Это обеспечивает высокую конформность облучения, подведение более высокой дозы в область опухолевого узла и защиту здоровых тканей за его пределами.

При использовании протонов учитывается их относительная биологическая эффективность (ОБЭ) — 1,1 по отношению к фотонам высоких энергий. Международная комиссия по радиационным единицам и измерениям (International Commission on Radiation Units and Measurements — ICRU) рекомендовала использовать эту величину коэффициента во всем спектре SOBP. Многочисленные исследования, в том числе выполненные в последнее время, показали, что значение коэффициента ОБЭ не является постоянной величиной и зависит от множества факторов: начальной энергии, линейной передачи энергии (ЛПЭ), дозы за одну фракцию, положения в SOBP, радиочувствительности ткани (соотношение α/β) и критериев оценки биологической эффективности [4, 7-9]. Эта многофакторность предполагает, что ОБЭ является непрерывной переменной. Поскольку в разных центрах протонной терапии применяются различные системы модуляции пучка, обязательной частью доклинических и клинических исследований каждого пучка протонов является радиобиологическое тестирование с оценкой ОБЭ.

Целью настоящего исследования было определение ОБЭ пучка протонов первой отечественной установки для проведения протонной терапии «Прометеус», расположенной на базе МРНЦ им. А.Ф. Цыба, в экспериментах на культуре клеток меланомы В16F10.

Материалы и методика

Культура клеток В-16. В качестве экспериментальной тест-системы использовали культуру клеток мышинной меланомы В16F10. Культуру клеток получили из ГУЗ «Мо-

сковский НИИ медицинской экологии», выращивали в монослое в культуральных флаконах (Corning, США) в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция) и гентамицина (ПанЭко, Россия) в количестве 0,01 мг/мл среды. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (МСО-5АС, Sanyo, Япония) при температуре +37°C и 5% содержании CO₂. Характеристика клеточной линии приведена в ранее опубликованной работе авторов [3].

В день эксперимента клетки снимали с пластика смесью растворов версена (0,02%, ПанЭко, Россия) и трипсина (0,25%, ПанЭко, Россия) в соотношении 1:1, ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки, до получения одиночных клеток, которые подсчитывали в камере Горяева и разводили до нужной концентрации (300-600 тыс. в 1 мл). Для облучения клеточную суспензию разливали в микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф (Genfollow, Китай) по 1,3 мл. До облучения и после клетки содержали при пониженной температуре (на льду). Облучение проводили при комнатной температуре.

Клоногенная активность клеток. После облучения определяли клоногенную активность клеток. Для этого клетки ресуспендировали, уточняли их количество в камере Горяева (Минимед, Россия), разводили до нужной концентрации и высевали (от 1000 до 72 000 клеток на чашку в зависимости от дозы облучения) в чашки Петри диаметром 100 мм (Corning, США) в среду RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки выдерживали в CO₂-инкубаторе при температуре +37°C течение 7-8 суток до формирования видимых невооруженным глазом колоний. По окончании инкубации культуральную среду удаляли, колонии окрашивали 2% раствором метиленового синего в 50% этаноле. Подсчет колоний вели на ручном счетчике Scan 100 (Interscience, Франция), учитывая колонии, содержащие 50 и более клеток. Фракцию клоногенных клеток выражали в процентах по отношению к высевным при каждой дозе облучения с учетом выживаемости клеток в контроле.

Источник протонного излучения. Облучение проводили на установке «Прометеус» разработки ЗАО «Протом» (ускорение протонов производится синхротроном, вывод пучка горизонтальный) в водном фантоме. Расстояние от передней стенки фантома до устройства сканирующего вывода протонов составляло 70 см. Верификация положения фантома была проведена с двух направлений (0 и 90 градусов). Пробирку с клеточной суспензией после встряхивания на вортексе (V-1 Plus, Biosan, Латвия) помещали в центральное отверстие крышки водного фантома.

Облучение протонами проходило с трех направлений (0, 90 и 180°). Перед началом эксперимента был рассчитан план облучения. Доза облучения составила 2 Гр, объем PTV (Planning Target Volume — планируемый объем мишени) — 24,2 см³ при облучении с одного и 18,5 см³ при облучении с трех направлений. Для облучения протонами в дозах 4, 6 и 8 Гр использовали указанный план облучения, повторенный 2, 3 и 4 раза соответственно. Пауза между фракциями не превышала 10 с при облучении с одного и 20 с — при облучении с трех направлений (полей). Средняя мощность дозы при однополюсном облучении составляла 2,2 Гр/мин (время от запуска облучения до сигнала системы об его окончании), при трехполюсном — 0,84 Гр/мин.

Энергия протонов на входе в фантом при облучении с одного поля составляла в среднем 78,9 МэВ. Данные по средней, минимальной и максимальной энергиям при трехполюсном облучении представлены в табл. 1. В ходе сеансов облучения средний поток протонов при 2 Гр составил 1,82·10¹⁰ и 1,94·10¹⁰ частиц при однополюсном и трехполюсном облучениях соответственно. В зависимости от энергии пучка его диаметр варьировался от 3,7 до 6,8 мм. Облучение проходило в центре распределенного пика Брэгга.

Таблица 1. Энергия сканирующего пучка протонов на выходе из источника

Угол облучения, град.	0	90	180
Среднее значение энергии (X ± S), МэВ	82,5 ± 5,8 (n = 20)	74,5 ± 11,1 (n = 26)	78,1 ± 8,3 (n = 22)
Минимум, МэВ	73,0	47,5	53,0
Максимум, МэВ	92,0	89,0	89,5

До проведения экспериментов с клетками планы облучения проверялись с использованием цилиндрической ионизационной камеры ТМ30010-1, которую устанавливали в водном фантоме в тех же условиях, что и клетки. Оценка величины ЛПЭ проводилась с использованием расчетных методов Монте-Карло.

Источник фотонов. Источником стандартного излучения служила гамма-установка «Луч» (Co⁶⁰, E_{ср} = 1,25 МэВ). Мощность дозы ~ 1 Гр/мин. Дозы облучения: 2, 4, 6, 8, 10 Гр. Пробирки с клеточной суспензией после встряхивания облучали на столе в горизонтальном положении (без фантома).

Источник электронов. В качестве дополнительного стандартного источника излучения использовали отрицательно заряженные частицы — электроны. Источник излучения — импульсный терапевтический ускоритель электронов (Novac-11, Италия). Энергия электронов ~ 10 МэВ, частота импульсов 1 Гц, мощность дозы ~ 3,3 Гр/мин, дозы облучения: 2, 4, 6, 8 Гр. Пробирки с клеточной суспензией встряхивали и облучали горизонтально на специальной подставке на предметном столе (без фантома).

Статистическая обработка. Биологические эксперименты на всех источниках излучения были повторены 4 раза. Полученные данные по выживаемости клеток обрабатывали при помощи статистического программного обеспечения R (www.R-project.org) версии 3.4.1 и графического приложения Veusz версии 2.0.1.

Для построения дозовых зависимостей использовали линейно-квадратичную модель. Соответствие экспериментальных данных указанной модели оценивали по критерию χ². Погрешность измерения дозы для протонов, электронов и фотонов в соответствии с аттестационной документацией дозиметрической аппаратуры находилась в пределах 5%. Погрешность оценки выживаемости клеток была установлена ранее и составила около 23,2% — были учтены, в том числе, ошибки при подсчете клеток в камере Горяева и количества колоний по итогам эксперимента [1]. При расчете ОБЭ погрешность выживаемости клеток (полученную по данным линейно-квадратичной модели), считали равной 5%, погрешность оценки ОБЭ — 10%.

Результаты и обсуждение

Дозовые зависимости клоногенной активности клеток мышинной меланомы В-16 после облучения протонами и гамма-излучением приведены на рис. 1.

Как следует из рисунка, дозовые зависимости для обоих типов излучений хорошо описываются линейно-квадратичной моделью, все кривые для протонов находятся ниже кривой гамма-излучения, что закономерно (с учетом более высокой биологической эффективности). Протонное и гамма-излучения при этом относятся к редкоионизирующим: в случае протонов ЛПЭ варьировалась от 3 до 8 кэВ/мкм, для гамма-квантов принято значение 0,3 кэВ/мкм. Экспе-

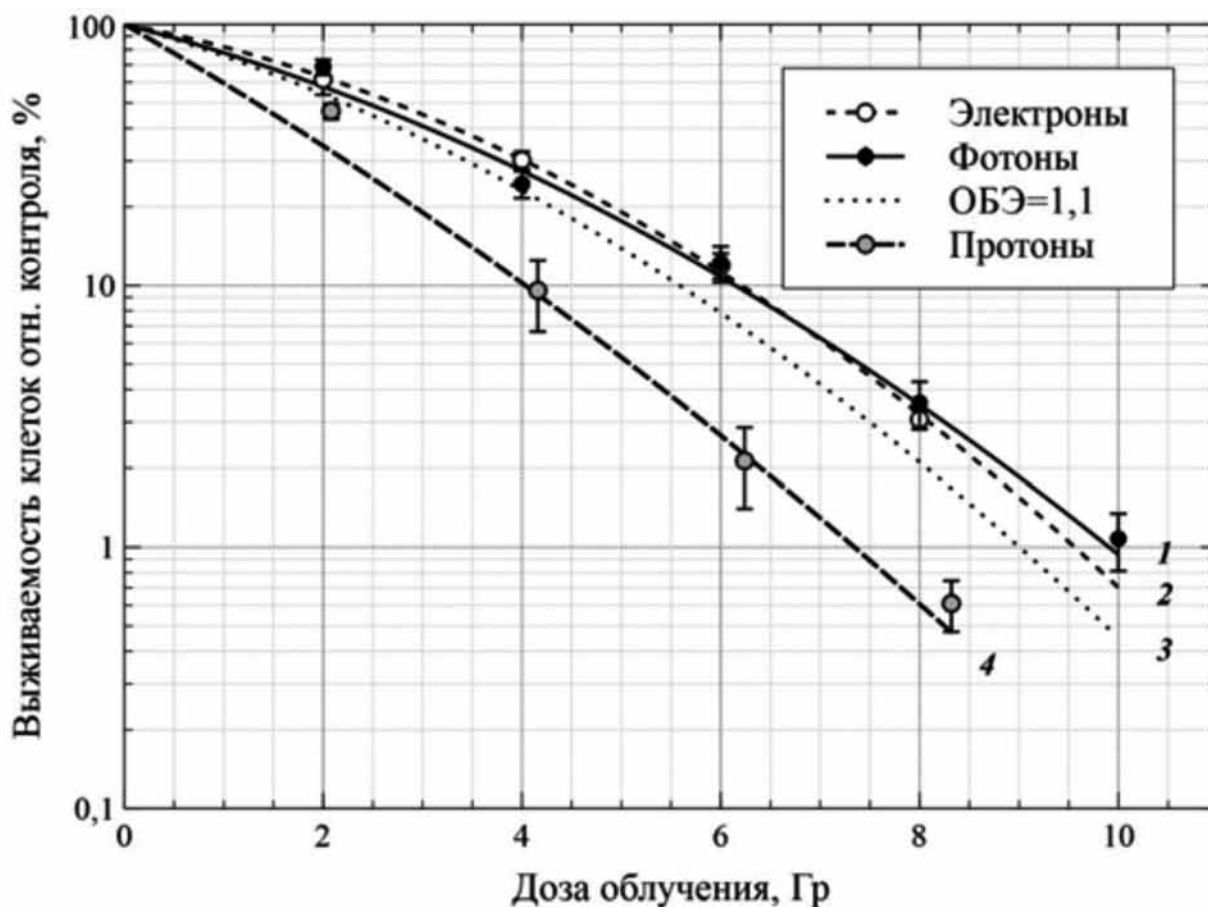


Рис. 1. Зависимость выживаемости клеток В-16 от дозы γ -квантов, электронов и протонов

риментально полученные данные по протонам располагаются ниже расчетной кривой, что свидетельствует об их более высокой биологической эффективности ($> 1,1$).

Малый изгиб кривых подтверждает высокое соотношение a - и b -коэффициентов, что характерно для быстро пролиферирующих, в том числе опухолевых клеток, к которым относятся клетки мышиной меланомы В-16. С увеличением ЛПЭ излучения значение параметра a/b возрастает.

Значения показателя ОБЭ, рассчитанные на уровне 10% выживаемости клеток, для дозы 2 Гр для γ -излучения (стандартная РОД в лучевой терапии) и по соотношению a/a (максимальная ОБЭ), приведены в табл. 2. Для сравнения приводятся ранее опубликованные данные по ионам углерода [1]

Таблица 2. Значения коэффициентов ОБЭ, рассчитанных на основании дозовых зависимостей выживаемости клеток В-16

Тип излучения	ОБЭ _{a/a}	ОБЭ _{2 Гр}	ОБЭ _{10%}
Протоны	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Ионы углерода: плато	2,6 ± 0,3	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,2
Ионы углерода: пик	6,8 ± 0,7	5,6 ± 0,6	4,1 ± 0,4
Электроны	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1

Как видно из табл. 2, значение коэффициента ОБЭ протонного излучения отличается в большую сторону от общепринятого значения и составило на уровне 10% выживаемости клеток 1,5. Значение коэффициента на уровне выживаемости, соответствующем дозе фотонов 2 Гр, составило 1,9.

На сегодняшний день в мире исследования по оценке ОБЭ в нескольких положениях пика Брэгга (SOBP) были преимущественно проведены с использованием методов пассивного рассеяния, а для узких сканирующих пучков для анализа доступны ограниченные данные. Согласно исследованию I. Ibanez et al. [6] ОБЭ протонов, рассчитанное по показателю 10% выживаемости клеток меланомы В16, в области плато — до пика на кривой Брэгга (ЛПЭ — 3,4 кэВ/мкм) составляет 1,0, а в пике Брэгга (ЛПЭ — 14 кэВ/мкм) — 1,6. С учетом того, что в нашем исследовании был использован сканирующий пучок, усредняющий ЛПЭ (диапазон варьирования по облучаемому объему — 3÷8 кэВ/мкм), можно считать, что наши данные совпали с результатами I. Ibanez et al.

Согласно собранным T. Friedrich et al. данным [5], полученным на наиболее часто исполь-

зумых клеточных культурах, ОБЭ протонов по показателю 10% выживаемости клеток в диапазоне значений ЛПЭ $3 \div 8$ кэВ/мкм варьирует от 0,95 до 1,47.

В исследовании O. Keta et al. [7] была проведена оценка радиочувствительности клеточной линии меланомы человека HTB140 к протонному излучению медицинского комплекса на базе Национального института ядерной физики (Катанья, Италия). Облучение проводили в середине SOBП терапевтического протонного пучка при мощности дозы 15 Гр/мин. Оценочное значение ЛПЭ составило 4,7 кэВ/мкм. Значение ОБЭ на уровне выживаемости, соответствующем 2 Гр по гамма-излучению, составило 2,1, что несколько выше, чем в проведенных нами экспериментах.

В работе, выполненной на установке ИВА [9], значения ОБЭ по показателю 10% выживаемости составили на входе в пик Брэгга (среднедозовая ЛПЭ 1,0 кэВ/мкм) 1,15, в проксимальной части пика (ЛПЭ 2,0 кэВ/мкм) — 1,23, в средней (ЛПЭ 2,5 кэВ/мкм) — 1,37, в дистальной (ЛПЭ 4,7 кэВ/мкм) — 1,53. В целом значения ОБЭ в средней части распределенного пика Брэгга сопоставимы с полученными нами данными (1,37 против 1,50), несмотря на то, что уровни энергий протонов отличались, в качестве тест-системы была использована другая клеточная линия (нормальные фибробласты кожи новорожденного человека CC-2509-Lonza) с иным соотношением α/β .

K. Maeda et al. [8] исследовали сканирующий карандашный пучок протонов ProBeat RT (Hitachi, Япония). В центре пика Брэгга ОБЭ_{10%} и ОБЭ_{2Гр} составляли 1,15 и 1,46 соответственно. В дистальной области отмечены более высокие значения ОБЭ (1,50 для ОБЭ_{10%} и 2,52 для ОБЭ_{2Гр}). Данные для середины распределенного пика Брэгга также сопоставимы с нашими результатами, хотя клетки линии V-79 имеют низкое соотношение α/β .

Биологическое действие протонов широко исследуется в течение длительного периода времени, но до сих пор однозначного ответа об оценке величины ОБЭ нет. Результаты проведенных нами исследований, в целом, как и ряд работ других авторов, выполненных *in vitro* в разных странах и на разных источниках излучения, показывают, что фактическое (полученное экспериментально) значение ОБЭ протонного излучения отличается от рекомендованного ICRU 1,1 в большую сторону. Большинство авторов указывает, что ОБЭ увеличивается с глубиной в распределенном пике Брэгга из-за возрастания ЛПЭ, достигая максимума в его дистальной части [8, 9].

Данная работа проводилась в рамках выполнения тем государственного задания МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиала ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России за 2015-2017 г.

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам центра протонной терапии на базе филиала за неоценимую помощь в проведении данного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бекетов Е.Е., Исаева Е.В., Трошина М.В., и др. Результаты предварительных исследований по оценке радиобиологической эффективности пучка ионов углерода ускорительного комплекса У-70 // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2017. — Т. 57— № 5. — С. 462-470.
2. Каприн А.Д., Галкин В.Н., Жаворонков Л.П. и др. Синтез фундаментальных и прикладных исследований — основа обеспечения высокого уровня научных результатов и внедрения их в медицинскую практику // Радиация и риск. — 2017. — Т. 26. — № 2. — С. 26-40.
3. Beketov E., Isaeva E., Koryakin S. et al. The study of biological effectiveness of U-70 accelerator carbon ions using melanoma B-16 clonogenic assay // Rad. Applic. — 2017. — Vol. 2. — I. 2. — P. 90-93.
4. Cuaron J.J., Chang C., Lovelock M., et al. Exponential increase in relative biological effectiveness along distal edge of a proton Bragg peak as measured by deoxyribonucleic acid double-strand breaks // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. — 2016. — Vol. 95. — I. 1. — P. 62-69.
5. Friedrich T., Scholz U., Elsässer T. et al. Systematic analysis of RBE and related quantities using a database of cell survival experiments with ion beam irradiation // J. Radiat. Res. — 2013. — Vol. 54. — I. 3. — P. 494-514.
6. Ibanez I., Bracalente C., Molinari B. et al. Induction and Rejoining of DNA Double Strand Breaks Assessed by H2AX Phosphorylation in Melanoma Cells Irradiated with Proton and Lithium Beams // Int J Radiat Oncol Biol Phys. — 2009. — V.74. — I. 4. — P. 1226-1235.
7. Keta O., Todorovic D., Popovic N., et al. Radiosensitivity of human ovarian carcinoma and melanoma cells to γ -rays and proton. // Arch Med Sci. — 2014. — V.10. — I.3. — P.578-586.
8. Maeda K., Yasui H., Matsuura T., et al. Evaluation of the relative biological effectiveness of spot-scanning proton irradiation *in vitro*. // J Radiat Res. — 2016. — V.57. — I.3. — P.307-311.
9. Michaelidesova A., Vachelova J., Puchalska M., et al. Relative biological effectiveness in a proton spread-out Bragg peak formed by pencil beam scanning mode // Australas. Phys. Eng. Sci. Med. — 2017. — Vol. 40. — I. 2. — P. 359-368.

Поступила в редакцию 16.01.2018 г.

*E.E. Beketov, E.V. Isaeva, N.V. Nasedkina,
E.P. Malakhov, O.Yu. Golovanova, L.N. Uliyanenko,
A.E. Chernukha, V.O. Saburov, O.G. Lepilina,
S.E. Uliyanenko*

**Biological efficiency of the proton scanning
beam of the therapeutic complex «Prometheus»
of the A.F. Tsyb Medical Radiological Research
Center in studies on cell culture of murine
melanoma B-16**

A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center,
National Medical Research Center of Radiology
Moscow

The basis for the use of protons for radiation therapy tasks is a fixed conventional value of their relative biological efficiency equal to 1,1. Numerous studies have showed that RBE of proton radiation is not a constant value and depends on a number of factors. The purpose of this study was to determine RBE of a thin scanning proton beam at the center of the distributed Bragg peak in experiments on the culture of murine B-16 melanoma cells. The cell suspension was irradiated in an aqueous phantom by a horizontal proton beam from three directions (0,90 and 180°) in doses from 2 to 8 Gy. Modulation of the energy of proton radiation was 47,5÷92,0 MeV. RBE protons were determined from the clonogenic activity of the cells compared with ⁶⁰Co gamma quanta. A linear-quadratic model was used to construct the dose dependencies. Obtained RBE values of proton radiation (LET 3÷8 keV/μm) differed in the big party from the generally accepted value and was at the level of 10% survival rate of 1.5. The results obtained generally coincided with data of foreign authors performed on different facilities.

Key words: proton therapy, scanning beam, RBE, clonogenic activity, melanoma B-16, LET