

*О.В. Корытов, Л.И. Корытова, А.Р. Ахтемзянов, В.П. Сокурено, М.И. Школьник,
Е.А. Маслюкова*

Эспериментальные модели радиационно-индуцированного цистита у лабораторных животных (обзор литературы)

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России), Санкт-Петербург

За последние 20 лет отмечается тенденция к повышению онкологической заболеваемости в большинстве государств, в частности в США и РФ, по ряду локализаций, например, раку простаты, тела матки, прямой кишки и раку мочевого пузыря [6]. В лечении опухолей этих локализаций одним из основных способов, а для некоторых и единственным, является лучевая терапия.

Частота острых лучевых циститов, согласно современным публикациям, при облучении органов малого таза составляет от 5 до 80% в течение 100 дней, а частота поздних лучевых осложнений колеблется от 5 до 50%, которые могут возникнуть в сроки от 3 мес. после окончания лучевой терапии до 20 лет [1, 2, 4, 5, 8].

Для изучения эффективности различных новых лекарственных средств разрабатываются модели радиационно-индуцированного цистита на экспериментальных животных, которые не являются максимально доступными для воспроизведения, не соответствуют условиям облучения в клинической практике, а в некоторых случаях выполняются с причинением излишних страданий экспериментальным животным [18]. Авторы предлагают новый, наиболее приближенный к клинической практике способ получения радиационного цистита [7].

Ключевые слова: лучевая терапия, лучевой цистит, рандомизированные исследования, радиационно-индуцированный цистит, экспериментальная модель

В 2017 в Российской Федерации впервые были выявлены онкологические заболевания у 617 177 человек, что на 3% выше, чем в 2016 году и на 23,2% выше, чем в 2007 году [6].

Среди впервые заболевших, у 24,03% опухоли локализовались в малом тазу. В схему комбинированного лечения этих опухолей входит лучевая терапия в радикальных дозах, что мо-

жет приводить к развитию радиационно-индуцированного цистита разной степени тяжести [3]. Эти осложнения могут нарушать планы лучевой терапии, существенно снизить качество жизни, а в самых тяжелых случаях, привести к летальному исходу.

В настоящее время не существует стандартов лечения радиационно-индуцированного цистита. В связи с этим, назрела необходимость разработки новых лекарственных средств для лечения лучевого цистита, с проведением предварительных, доклинических исследований, для выполнения которых необходимо создание экспериментальной модели радиационно-индуцированного цистита.

Малоэффективное лечение и непонимание молекулярных изменений, которые ответственны за прогрессирование данного осложнения, объясняются, отчасти, отсутствием доклинических моделей, которые могли бы имитировать радиационно-индуцированный цистит. Было описано несколько моделей радиационного цистита у лабораторных животных [1]. Однако, существует разнообразие в системах доставки излучения, различие в доставляемой дозе и ее распределении, а также видах животных, используемых в этих разрозненных исследованиях. Наряду с этим, в большинстве исследований отсутствует анализ гистологических изменений в стенке мочевого пузыря, развившихся в результате облучения.

Модели радиационно-индуцированного цистита на мышах

На сегодняшний день описаны две разные модели радиационного цистита у мышей. В первой модели, разработанной J. Jaal and W. Dörr [10], 8-12-недельных самок мышей C3H/Neu со средним весом 22 г облучали в дозе 20 Гр на рентгеновском аппарате Isovolt 320/20 (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA). Мощность дозы составила 0,85 Гр/мин на расстоянии ис-

точник-поверхность 42 см. Для оценки лучевых реакций мыши были забиты через 2-3-дневные интервалы между днями 0 и 31 (фаза раннего ответа). Для оценки лучевых осложнений секция проводилась на 90, 120, 180, 240, и 360 (фаза позднего ответа) день после облучения.

Во второй модели M. Kraft et al. [13] облучали мышей линии Munich C3H/Neu разовой дозой 19 Гр. Кроме того, авторы облучали мышей линии Amsterdam C3H/HeN Af-nu +, которые, как представляется, более радиорезистентны чем мыши Munich C3H/Neu из-за более высоких уровней эластичного коллагена типа III, который позволяет снизить радиочувствительность мочевого пузыря. При этом существует положительная корреляция между функцией мочевого пузыря, обилием коллагена и трансформирующим ростовым фактором бета (TGF-beta).

Радиационный ущерб в основном опосредуется пагубными действиями активных радикалов азота и кислорода (RNS и ROS). Следовательно, поглотители свободных радикалов образуют основную группу радиозащитных агентов. Полученные результаты предполагают, что основной точкой приложения радиационно-индуцированной генерации свободных радикалов являются митохондрии, и действующие там антагонисты оксида азота (NOS) являются радиопротекторами [16, 17].

I. Zabbarova et al. [18] разработали и синтезировали новый класс селективных радиопротекторов на основе антагонистов NOS. Чтобы проверить их действие *in vivo*, исследователи использовали модель мыши, у которой облучали область таза. Исходя из того, что дисфункция мочевого пузыря может быть вызвана не только прямым облучением, но и кросс-сенсбилизацией другими раздраженными органами малого таза (например, толстой кишкой), авторы разработали новую модель для определения *in vivo* радиационного цистита, и его профилактику радиозащитными соединениями. Был представлен следующий дизайн исследования. Мышей анестезировали с использованием пентобарбитала натрия (75 мг / кг, IP) и через небольшой надрез по передней линии живота извлекали мочевой пузырь наружу с помощью лигатуры. Мышь помещали на платформе Лексан (Lexan platform), что позволяло удерживать мочевой пузырь вне брюшной полости во время облучения. Облучение проводили на линейном ускорителе Varian 6 МэВ в дозе 2 Гр., ограничиваясь только изолированным мочевым пузырем. После сеанса лучевой терапии мочевой пузырь помещали обратно в полость таза, разрез зашивали и оставляли животных под наблюдением. Авторы считают, что новая модель избирательного облучения мочевого пузыря позволит оце-

нить роль новых радиопротекторных средств для профилактики и лечения радиационного цистита.

Интересной представляется работа, проведенная Bernadette M.M. Zwaans et al. [9]. Для моделирования радиационного цистита использовалось программное обеспечение для планирования лечения (Muriplan), аналогичное тому, которое применяется при лучевой терапии у человека. Программа позволяла точно фокусировать запланированную дозу на мочевой пузырь. Облучение для каждого животного (мышь) осуществляли в течение 30-60 минут. Компьютерная томография и планирование лечения выполняли с контрастом и без него у нескольких испытуемых животных. Несколько возможных планов лечения (2 или 3 поля, дуга, 5×5 или 10×10 коллиматор) сравнивались с использованием гистограмм объем-доза. В исследовании было показано, что однократное облучение в дозе 20 Гр у мышей C3H/HeN вызывает учащенные мочеиспускания, начиная с 17 недель после облучения, с одновременным уменьшением объема мочи при разовом мочеиспускании. Радиационно-индуцированный цистит в модели на мышах проявлялся умеренным увеличением фиброза, однако, значимых различий в фиброзе между двумя группами лечения не было достигнуто. Возможно, это было связано с небольшим количеством животных, включенных в исследование. Кроме того, отмечалось умеренное увеличение воспаления ($p>0,05$). Отсутствие сильного воспалительного и фиброзного ответов может зависеть от разовой дозы, потому что радиационное повреждение положительно коррелирует с суммарной дозой. Повышение разовой или суммарной дозы, вероятно, приводит к более тяжелому циститу.

Восемь недельных мышей C3H/HeN (Charles River) были размещены в стандартных условиях существования, по пять мышей в клетке. Грызуны находились на безводной экструдированной диете без сои. C3H/HeN мыши были выбраны так как они считаются одними из наиболее подверженных фиброзу в ответ на радиацию [16]. Для этих исследований были использованы 10 самок. Самцов не взяли в исследование, в связи с тем, что самцы метили территорию, тем самым затрудняя исследование мочи. Облучение проводилось на блоке SARRP (Xstrahl Life Sciences) с центрацией на мочевой пузырь. Двадцать мышей облучили в разовой дозе 20 Гр, а 20 мышей включили в контрольную группу. Доза 20 Гр была выбрана на основе предыдущих исследований. Выбор этой дозы также был обусловлен прагматическими причинами разработки модели, а также возможностью сравнивать данные с предыдущими исследованиями [10, 17]. Перед

облучением проводили анестезию изофлураном для достаточной иммобилизации и фиксации животных. Непосредственно перед облучением выполнялась компьютерная томография (КТ), с изоцентром на уровне середины мочевого пузыря. Оконтуривание мочевого пузыря было выполнено без контраста, чтобы избежать ошибочного дозиметрического расчета, основанного на КТ изображениях. Планирование осуществлялось опытным оператором, имеющим опыт работы с животными, для избежания попадания ионизирующего излучения на здоровые органы. Для обеспечения полного охвата мочевого пузыря использовали 5-и миллиметровый коллиматор. Изоцентр последовательно устанавливали в центре мочевого пузыря, который легко визуализировался на ортогональных КТ-срезах. Оператор пытался ограничить воздействие ионизирующего излучения на позвоночник, нижние конечности и кишечник. Поля облучения были скорректированы для каждого животного. Для точного определения прохождения лучей и фокусировки дозы только на мочевом пузыре использовали ПО планирования лечения (Muriplan). Получение изображений и облучение одного животного занимало от 30 до 60 минут. По окончании сеанса облучения животные возвращались в прежнее жилище.

Таким образом, при разработке моделей лучевого цистита у мышей авторы применяли методики далекие от клинической практики. Во-первых, рентгенотерапевтические аппараты при лечении злокачественных опухолей малого таза в настоящее время не используются. Во-вторых, оперативное вмешательство, направленное на выведение мочевого пузыря наружу, с последующим его облучением и погружением обратно, могло приводить к интраоперационному повреждению органа, уменьшению размера в силу последующего развития спаечного процесса, изменению физиологии мочеиспускания, увеличению времени анестезии и неоправданному страданию животного. В-третьих, в остальных исследованиях для создания лучевого цистита применяли специальную радиационную установку SARRP, которая создает условия, резко отличающиеся по физико-техническим параметрам излучения от применяемого для лечения пациентов на источнике облучения, используемых в клинической практике.

Модели радиационного цистита на крысах

Радиационный цистит был индуцирован у крыс двумя механизмами. В первой модели взрослых самок инбредных крыс Льюис (200-250 г) облучали разовой дозой 20 Гр в течение 5 минут с использованием гамма-излучения

цезия-137, с применением свинцовой защиты. В предварительном исследовании подвели одно-моментно различные дозы от 5 до 30 Гр. В результате было установлено отсутствие признаков цистита при облучении дозами до 15 Гр. Доза облучения 30 Гр привела к чрезмерному выпадению шерсти у крыс, инфицированию и воспалению на участке облучения, развитию цистита и ректита. Следует отметить, что, хотя эта модель и вызывает радиационно-индуцированное воспаление мочевого пузыря, но не воспроизводит методику облучения, используемую для лечения людей. В практической медицине применяют несколько полей облучения и проводится более тщательная защита нормальных тканей в процессе формирования лечебного плана [15].

Rajaganapathy et al. [14] разработали модель облучения крыс, в которой 12-недельных самок крыс Sprague-Dawley (средний вес 250 г) облучали с использованием SARRP при 225Кв. Это позволило прицельно облучить мочевой пузырь и ограничить воздействие ионизирующего излучения на критические органы. Первым этапом с помощью компьютерного томографа визуализировали мочевой пузырь на КТ симуляторе. Выбирали расположение полей облучения для снижения поражения других тканей и сосредоточения дозы на мочевом пузыре. Через 6 недель после облучения на дозе 20 Гр не было получено признаков воспаления, на дозе 30 Гр, был обнаружен отек стенки мочевого пузыря с лейкоцитарной инфильтрацией. Подведение дозы 40 Гр привело к дегенеративным изменениям в эпителиальной выстилке мочевого пузыря.

Следовательно, модели лучевого цистита крыс, также, как и модели мышей, разрабатывались с применением аппаратуры не используемой в клинической практике.

Радиационный цистит на модели кролика

M. Kohler et al. [12], использовали взрослых самцов кроликов со средним весом 3,2 кг, которые получили общую дозу 33, 36 или 39 Гр в течение 5 дней с облучением всего мочевого пузыря, только краниальной или только каудальной части мочевого пузыря. Это единственная модель, в которой полная доза облучения доставляется за несколько фракций, имитируя режимы, применяемые в клинике. Облучение проводилось рентгеновским излучением с энергией 300 Кв через два противоположных боковых поля с расстояния источник-поверхность 50 см и мощностью дозы 0,8 Гр/мин. Ткань мочевого пузыря подверглась гистологическому анализу. Поражения были типичными для воспаления мочевого пузыря, зависели от дозы излучения и локализовались во всех слоях стенки мочевого пузыря: атро-

фия, потеря эпителия, гиперплазия, эрозия, и даже образование язв. Взрослые самцы New Sealand весом 2,8-3,5 кг были помещены в отдельные клетки и имели свободный доступ к воде и корму [12]. После анестезии животных закрепляли в специализированном держателе. Световое окно позволяло адаптировать радиационное поле под облучаемую часть пузыря (весь орган, верхняя или нижняя половина), что подтверждалось рентгенограммами. Группы из трех животных, получивших общую дозу 0 (группа контроля), 33, 36, или 39 Гр за 5 фракций за 5 дней. Период функционального тестирования (частота мочеиспускания и цистометрия) составил 100 недель. По окончании периода наблюдения (100-120 недель после облучения) животные умерщвлялись инъекцией 0,6 мл/кг Vetanarcol. Одна особь из группы «39 Гр-весь пузырь» была забита на 74 неделе из-за большой потери массы тела и одна особь из группы «36 Гр-весь пузырь» погибла на 75 неделе. Эти животные были исключены из исследования. Мочевой пузырь был препарирован, рассечен трансверзально и на одну неделю помещён в 4% раствор формальдегида. После фиксации образцы промывали водопроводной водой 3 часа, обезжировали в восходящих спиртах, и в конце помещали в ксилол на 36 часов и встраивали в парапласт. Срезы (5 мкм) окрашивали гематоксилин-эозином. Гистологическое исследование было двойное слепое: закодированные слайды без маркировки лечения были проанализированы двумя независимыми экспертами. Гистологическое исследование и подсчёт (степень и тяжесть изменений) выполняли, оценивая толщину, атрофию, гиперплазию, дистрофию, карциному (in situ и инвазивную), атипичные ядра, эрозии и кисты. В подслизистом слое оценивали отек, гемангиоэктазии, лимфангиэктазии, клеточную инфильтрацию, изъязвления, фиброз и эпителиальные скопления (гнезда). Оценочными параметрами мышечного слоя были: атрофия, гипертрофия, фиброз, гемангиоэктазии, лимфангиэктазии, клеточная инфильтрация. Образцы были разделены на «краниальные» и «каудальные» внутри каждой лечебной группы в соответствии с тем, какую часть пузыря облучали. Десять из 15 образцов на каждую часть пузыря и животное (в общем, от 20 до 30 на одного кролика) были проанализированы и оценены по шкале от 0 до 6, где 0 соответствовал отсутствию изменений, а 6 соответствовала резко выраженным изменениям. Заключительные результаты давали как усредненные подсчеты на группу.

В РНЦ РХТ им. Акад. А.М. Гранова была разработана новая модель радиоиндуцированного цистита на крысах и кроликах in vivo.

Для решения поставленной задачи животных анестезировали, формировали поля облучения, и на современном, высокоэнергетическом линейном ускорителе проводили облучение крыс до СОД 25 Гр, а кроликов до СОД 30 Гр через тканеэквивалентный болюс, смещающий максимум ионизации дозы в глубину на уровень мочевого пузыря животного. При этом облучение осуществляли фотонами с граничной энергией квантов 6 МэВ. Разработанный нами способ моделирования позволил получать модели с высоким (близким к 98%) выходом лучевого цистита при низком риске гибели экспериментальных животных [7].

Заключение

Таким образом, зарубежные экспериментальные модели радиоиндуцированных циститов характеризуются либо трудной воспроизводимостью, либо причинением излишних страданий животным, либо значительно отличаются от применяемых в клинике условий облучения. В то же время, разработанная авторами методика позволила сократить время облучения более чем в 4 раза по сравнению с наиболее близким аналогом, что в свою очередь обеспечило точность облучения и уменьшило токсичность лучевой терапии и наркоза. Использование стандартного линейного ускорителя как источника ионизирующей радиации позволяет получать модель в любом учреждении, оборудованном линейным ускорителем для проведения дальнейших научных разработок. Представленная модель оказалась полезной при доклиническом испытании новых лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бардычев М.С. Местные лучевые повреждения и их классификация // В кн. Диагностика и лечение поздних лучевых повреждений. – Обнинск, 1988. – С. 3-11.
2. Габелов А.А. Поздние лучевые циститы. Методические рекомендации. – Ленинград, 1975. – 26 с.
3. Жаринов Г.М., Винокуров В.Л., Заикин Г.В., Зорин А.В. Система прогнозирования поздних лучевых повреждений прямой кишки и мочевого пузыря у больных раком шейки матки // ИЕРОГЛИФ. – 2000. – Вып.12. – С. 22-24.
4. Иваницкая В.И. Осложнения лучевой терапии у онкологических больных. – Киев, 1989. – С. 184.
5. Кан Я.Д. Осложнения со стороны мочевых путей после лучевой и комбинированной терапии больных раком мочевого пузыря // Урол. и нефрол. – 1987. – № 3. – С. 42-45.
6. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. – Москва, 2018.
7. Кoryтов О.В., Кoryтова Л.И., Понежа Т.Е. и др. Патент на изобретение №2676431 «Способ моделирования лучевого цистита».

8. Курпешева А.К. Поздние лучевые повреждения мочевыводящих путей // Мед. Радиология. – 1986. – С. 51-53.
9. Bernadette M.M. Zwaans, Sarah Krueger, Sarah N. Bartolone MS, Michael B. Chancellor, Brian Marples, Laura E. Lamb. Modeling of chronic radiation-induced cystitis in mice // *Advances in Radiation Oncology*. – 2016. – Vol. 1. – P. 333-343.
10. Jaal J., Dörr W. Radiation Induced Inflammatory Changes in the Mouse Bladder: The Role of Cyclooxygenase-2 // *The Journal of Urology*. – 2006. – Vol. 175. – I. 4. – P. 1529–1533.
11. Kohler M., Michel C. Zimmermann A. Histological changes after fractionated whole or partial irradiation of the rabbit urinary bladder // *Acta. Oncologica*. – 2009. – Vol. 34. – № 2. – P. 199-204. – doi: 10.3109/02841869509093956.
12. Kohler M., Eppenberger H., Imogen Cordt-Riehle, Christian Michel. Urination frequency and cystic pressure resistance after fractionated whole or partial irradiation of the rabbit urinary bladder // *Acta Oncologica*. – 1992. – Vol. 31. – №6. – P. 673-677. –doi:10.3109/02841869209083852.
13. Kraft M., Oussoren Y., Stewart F.A., Dörr W. Schultzhector S. Radiation-induced changes in transforming growth factor beta and collagen expression in the murine bladder wall and its correlation with bladder function // *Radiat. Res*. – 1996. – Vol. 146(6). – P. 619-627.
14. Rajaganapathy B.R., Janicki J.J., Levanovich P. et al. Intravesical liposomal tacrolimus protects against radiation cystitis induced by 3-beam targeted bladder radiation // *J. Urol*. –2015. – Vol. 194(2). – P. 578-584. – doi: 10.1016/j.juro.2015.03.108.
15. Soler R., Vianello A., Füllhase C. et al. Vascular therapy for radiation cystitis // *Neurourol. Urodyn*. – 2011. – Vol. 30(3). – P. 428-434. – doi: 10.1002/nau.21002.
16. Stewart F.A. The proliferative and functional response of mouse bladder to treatment with radiation and cyclophosphamide // *Radiation. Oncol*. – 1985. – Vol. 4. – P. 352-362.
17. Wong J., Armour E., Kazanzides P. et al. High-resolution, small animal radiation research platform with x-ray tomographic guidance capabilities // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. – 2008. – Vol. 71(5). – P. 1591-1599. – doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.04.025.
18. Zabbarova I., Wipf P., Birder L. et al. Mouse model for characterization of radiation cystitis and its prevention using a new class of radioprotectors // *ICS*. – 2009. – A. 268.

O.V. Korytov, L.I. Korytova, A.R. Akhtemzyanov, V.P. Sokurenko, M.I. Shkolnik, E.A. Maslyukova

Experimental models of radiation-induced cystitis in laboratory animals (literature review)

Federal State Budgetary Institution «Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies named after Academician A.M. Granova» of the Ministry of Health of the Russian Federation Russia, St. Petersburg

Over the past 20 years, there has been a trend towards an increase in cancer morbidity in most states, in particular in the US and Russia, for a number of localizations, for example, prostate cancer, uterus, rectum and bladder cancer [6]. These localizations require radiation therapy at least as a part of multi-modal approach, or, quite often, as an independent method of treatment.

However, frequency of acute radiation cystitis, according to current publications, after irradiation of the pelvis, remains high 5 to 80% for 100 days/ Frequency of late radiation complications, which can occur from 3 months after the end of radiation therapy up to 20 years ranges from 5 to 50% [1, 2, 4, 5, 8].

There is a need for randomized, controlled trials to determine standards in the treatment of this formidable complication of radiation therapy. Models of radiation-induced cystitis in animals are being developed to study possible ways of treatment but they are either not easy to reproduce, do not imitate treatment regimes in humans to full extent, or cause unnecessary suffering to experimental animals [18]. Authors suggested new model of radiation-induced cystitis closely resembling regimes used in real patients [7].

Key words: radiation therapy, radiation cystitis, randomized studies, radiation-induced cystitis, experimental model

Поступила в редакцию 09.02.2019 г.