ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторы 4
Список сокращений и условных обозначений 5
Введение 8

Глава 1. Основные процессы и стадии взаимодействия ионизирующего излучения с биологическими объектами 13

Глава 2. 6 R радиобиологии — наиболее важные биологические факторы ответа опухолевых и нормальных клеток/тканей на фракционированное облучение 16
Литература 36

Глава 3. Гибель облученных клеток: основные типы и механизмы[1] 37
Литература 56

Глава 4. Опухолевые стволовые клетки 57
Литература 64

Глава 5. Прогностические радиобиологические модели в клинической практике 65

Глава 6. Предикторы радиочувствительности 75

Глава 7. Модификация радиочувствительности в лучевой терапии . . 86

Глава 8. Клинико-радиобиологические особенности стереотаксической лучевой терапии 97
Литература к главам 5–8 105

Заключение 106
Приложение 108
Литература 122

[1] Глава написана А.Е. Кабаковым.

ВВЕДЕНИЕ

Достижениям современной онкологии трудно не удивляться. За последние десятилетия целый ряд состояний, характеризовавшихся ранее как безнадежные и инкурабельные, перешел в разряд контролируемых хронических заболеваний с длительными стойкими ремиссиями. И далеко не последняя роль в реализации этого успеха принадлежит современным методам лучевой терапии (ЛТ), позволяющим контролировать опухолевый процесс не только на ранних стадиях, но и в случае местнораспространенных и метастатических форм поражения. Несмотря на бурное развитие химиотерапии, таргетной и иммунотерапии, вклад именно лучевого лечения оказывается во многих случаях гораздо более заметным, чем иных консервативных компонентов лечебной программы (**рис. 1**).

Анализ представленных данных свидетельствует, что вклад химиолучевого лечения в 5-летнюю выживаемость сопоставим со вкладом самостоятельной ЛТ лишь при опухолях головного мозга и раке прямой кишки, а превышает его только у больных раком пищевода. Во всех остальных ситуациях ЛТ как дополнительный компонент лечебной программы продолжает играть ведущую роль.

Реализация ЛТ уже в течение многих лет регламентируется рекомендациями Международной комиссии по радиационным единицам и измерениям: МКРЕ-50, МКРЕ-62, МКРЕ-83 (ICRU report 83; De Luca et al., 2010), в которых вводятся понятия лечебных объемов, определяются методы нормирования дозы, принципы создания лечебного плана, необходимого для реализации заданных условий.

Принципиальным этапом предлучевой подготовки является расчет дозового распределения с помощью специальных математических программ прямого и инверсного 3D- и 4D-планирования на компьютерных станциях. Процедура планирования заключается в выборе оптимального набора полей облучения с учетом веса каждого, использовании устройств формирования полей (многолепестковых коллиматоров, клиновидных фильтров, индивидуальных блоков, поглотителей). Важнейшим средством оценки качества плана облучения являются гистограммы «доза–объем» (DVH — dose–volume histogram). DVH представляет собой график распределения дозы в облучаемом объеме. Критериями качества конкретного плана облучения могут служить параметры, отражающие гомогенность дозного распределения в мишени: V95% [% PTV (планируемый целевой объем), охваченный 95% предписанной дозы]; V100%/V95% (отношение

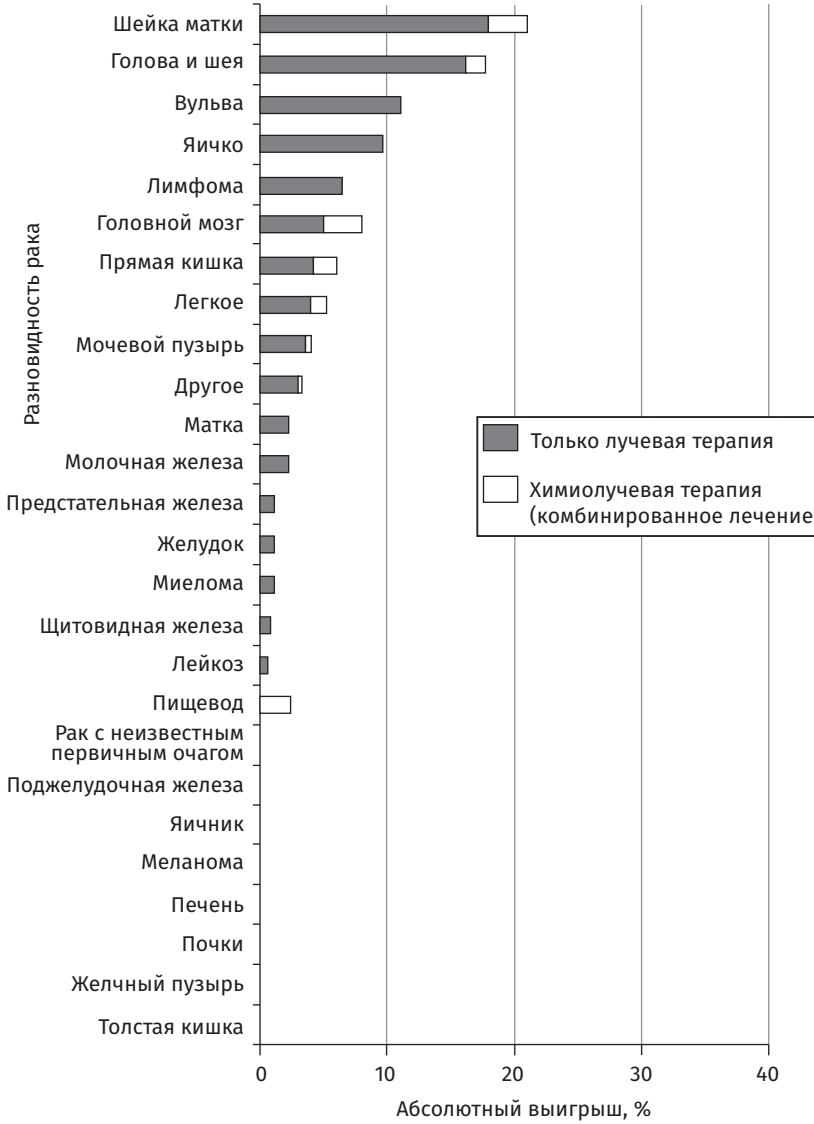

Рис. 1. Абсолютный выигрыш в 5-летней общей выживаемости в случае дополнительного использования только лучевой терапии или химиолучевой терапии (темная или светлая часть столбцов соответственно) при различных новообразованиях (по Hanna T., Shafiq J., Delaney G., Vinod S., Tompson S., Barton M. The population benefit of evidence-based radiotherapy: 5-Year local control and overall survival benefits // Radiother Oncol. 2018. Vol. 126. P. 191–197)

объемов мишени, получающих 100% и 95% предписанной дозы); Dmax/min (максимальная и минимальная доза в очаге). Риски побочных эффектов оцениваются по уровню максимальных доз в критических органах или доз, поглощенных различными объемами критических органов, например V20, V50 — объем здоровой ткани (легкого, печени, почки и др.), получающий дозу 20 Гр или 50 Гр. Наиболее полное представление о толерантных дозах для нормальных тканей в настоящее время можно составить на основе рекомендаций QUANTEC (Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic) (Marks L.B., 2010).

Способы реализации дистанционной ЛТ весьма многообразны. Сегодня уже и аппараты для дистанционной γ-терапии, не говоря о современных медицинских ускорителях, комплектуются многолепестковыми коллиматорами, позволяющими проводить полноценную 3D-конформную ЛТ (3D CRT). Различные вариации ЛТ с модуляцией интенсивности пучка (IMRT), облучение с управляемым дыханием (respiratory gating) и под контролем изображения (IGRT), технологии динамической объемно-модулированной ЛТ (VMAT, RapidArc) прочно вошли в клиническую практику. В течение многих лет выпускаются специализированные аппараты для суперпрецизионного стереотаксического облучения, позволяющие реализовать технологии стереотаксической радиохирургии (SRS), стереотаксического фракционированного облучения (SRT), а также стереотаксической лучевой терапии (SBRT) экстракраниальных локализаций. Непременным условием качественного выполнения этих процедур является возможность контроля и коррекции позиционирования, как правило, с помощью ортовольтной рентгеноскопии/рентгенографии либо компьютерной томографии в коническом пучке (CBCT — Cone Beam CT). В последние годы активно развивается направление, получившее название адаптивной радиотерапии (ART), суть которого состоит в динамической оценке состояния мишени и органов риска (как правило, на основе данных, полученных с помощью современных технологий магнитно-резонансной томографии и позитронно-эмиссионной томографии в сочетании с компьютерной томографией) и последующего репланирования облучения.

Несмотря на постоянное совершенствование старых и появление новых технологий облучения, задача перед ними ставится прежняя — ***подведение оптимальной*** (причем не всегда максимально возможной) ***дозы к мишени при минимальном воздействии на неповрежденные структуры***.

Наряду с технологиями облучения, обеспечивающими максимальную прецизионность воздействия, в основе ЛТ лежат теоретические представления, сформированные в результате радиобиологических

исследований. Радиобиология обеспечивает понимание механизмов ответа опухолевых и нормальных тканей на облучение, тем самым помогая объяснить наблюдаемые явления. К таким механизмам относятся, например, процессы реоксигенации и репопуляции клеток опухоли, оказывающие значительное влияние на эффективность ЛТ. Трудно переоценить открытие феноменов репарации радиационных повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и контроля клеточного цикла, которые в настоящее время подробно изучены на молекулярном уровне, что позволило разработать ряд средств селективной радиосенсибилизации опухолевых клеток. Эти радиобиологические разработки внедрены в клиническую практику, и можно надеяться на успешное продолжение работы в этом направлении. Радиобиология инициирует создание новых подходов в ЛТ. В качестве примера можно привести использование сенсибилизаторов гипоксических клеток, плотноионизирующих излучений, гипофракционирование. Результаты радиобиологических исследований учитываются при разработке оптимальных режимов ЛТ в комбинации с химио- или иммунотерапией. Еще одним перспективным направлением радиобиологических исследований является разработка методов и маркеров для прогнозирования индивидуального ответа опухолевой и нормальной ткани на ЛТ. В последние годы работа в этом направлении особенно активизировалась в связи с быстрым внедрением и постепенным удешевлением методов полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) и секвенирования нового поколения (NGS), клиническую полезность которых еще предстоит выяснить. Вместе с тем с сожалением надо признать наличие серьезных ограничений в трансляции результатов радиобиологических исследований в клиническую практику, связанных прежде всего с отсутствием адекватных экспериментальных моделей. Тем не менее радиобиологическое планирование является важным этапом подготовки к ЛТ в связи с необходимостью учета закономерностей ответа нормальных и опухолевых тканей на радиационное воздействие и выбором на этой основе оптимальной схемы лечения из различных вариантов использования электромагнитных и корпускулярных излучений, включая многообразие возможных вариантов фракционирования дозы.

Современная ЛТ включает набор отдельных технологий, обеспечивающих точность, надежность, безопасность и воспроизводимость лечебных процедур. Сегодня эти требования часто объединяют понятием «конформность». Реализация, к примеру, так называемой 3D-конформной ЛТ, в том числе и на современных ускорительных комплексах, невозможна без выполнения ряда условий:

- наличия корректного объемного изображения первичной опухоли (или ее ложа) и окружающих структур, полученного с помощью современных методов лучевой диагностики;
- учета возможного физиологического смещения мишени и органов риска в процессе сеанса облучения;
- компенсации межфракционного изменения взаиморасположения тканей и органов, например с помощью жесткой иммобилизации пациента на процедурном столе;
- контроля позиционирования.

Важнейшим условием успеха лучевого лечения является его качественное планирование. Сегодня в основе стандартного объемного (3D) планирования ЛТ лежит использование серий параллельных компьютерных томографических сканов и реконструкций, когда мишень и иные анатомические структуры определяются и оконтуриваются на каждом из сканов вручную или автоматически, с помощью специализированных математических программ. Однако современное планирование трудно себе представить без набора данных магнитно-резонансной томографии и позитронно-эмиссионной томографии в сочетании с компьютерной томографией, которые объединяются с данными компьютерной томографии путем слияния (fusion). Это заметно повышает точность и надежность современной предлучевой подготовки.

Быстрое развитие в последние годы молекулярной и клеточной радиобиологии, с одной стороны, и технологическое совершенствование ЛТ, с другой — определили актуальность совместного анализа радиобиологических и клинических аспектов ЛТ с учетом последних достижений в этих областях. В книге рассмотрены результаты основополагающих радиобиологических исследований в области теоретического обоснования и практического применения ЛТ (в историческом аспекте), а также проведен анализ современных радиобиологических представлений об основных факторах и процессах, определяющих эффективность ЛТ, включая так называемые 6 R радиобиологии — репарацию, реоксигенацию, репопуляцию, распределение (перераспределение) по фазам клеточного цикла, радиочувствительность и реактивацию иммунного ответа. Далее сделан обзор практического использования радиобиологических знаний, в том числе планирование ЛТ на основе различных радиобиологических моделей и модификация радиочувствительности за счет изменения мощности дозы, снижения гипоксии в опухолевой ткани, использования оксидомиметиков и селективных ингибиторов гипоксических клеток, гипертермии, применения излучений с высокой линейной передачей энергии. Среди клинических аспектов ЛТ значительное внимание уделено современному состоянию проблемы прогнозирования эффективности ЛТ, включая значение дозово-объемных параметров облучения и оценку индивидуальной радиочувствительности нормальных и опухолевых тканей.

Глава 4. Опухолевые стволовые клетки

Как известно, гетерогенность опухолевых клеток по морфологическим и функциональным признакам (в том числе по чувствительности к радиационным и химическим воздействиям) является фундаментальным свойством злокачественных опухолей, которое значительно осложняет эффективное использование ЛТ. К общепризнанным причинам гетерогенности опухолевых клеток по радиочувствительности относится генетическая нестабильность опухолевых клеток, в результате которой могут возникать разные по чувствительности клоны, различный уровень оксигенации в разных участках опухоли, изменения по чувствительности в разных фазах клеточного цикла и т.д. Кроме того, в последние годы активно развивается представление об иерархическом строении ЗНО и существовании особых клеток, которые являются родоначальниками гетерогенных клонов, составляющих опухоль (**рис. 4.1**). Они отличаются от остальных опухолевых клеток по туморогенной активности и сходны с СК нормальных тканей по ряду молекулярно-биологических и структурно-функциональных особенностей (профиль генной экспрессии, набор белковых маркеров на поверхности клеток, интенсивное удаление лекарственных препаратов и липофильных красителей и т.д.). Эти клетки получили название ОСК; в различных литературных источниках их называют также стволоподобными (stem-like) или опухоль-инициирующими клетками (tumor initiating cells). Впервые существование ОСК было доказано более 20 лет назад: в 1997 г. при остром миелоидном лейкозе (в работе Bonnet D., Dick J.E.) и в 2003 г. при раке молочной железы (в работе Al-Hajj M. et al.), хотя предположения о наличии этой клеточной популяции появились намного раньше. В обеих работах были идентифицированы опухолевые клетки человека с редким иммунофенотипом ($CD34^{+}CD38^{-}$ при лейкозе и $CD44^{+}CD24^{-/low}$ при раке молочной железы), выделены с помощью проточноцитометрической сортировки и введены в организм иммунодефицитных мышей. Указанные клеточные популяции в отличие от остальных клеток были способны к самообновлению, дифференцировке и формированию опухолей с присущей им исходной гетерогенностью.

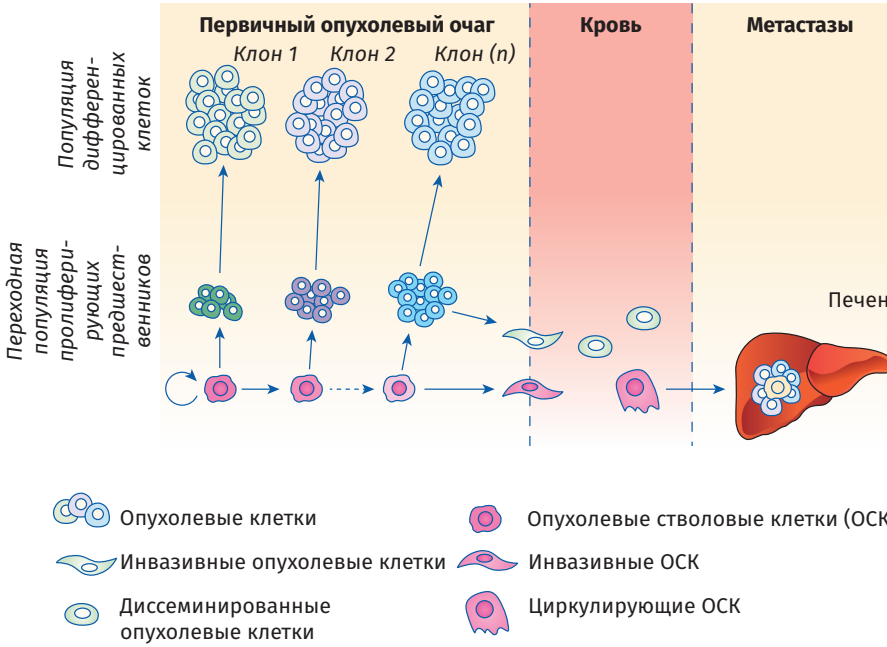

Рис. 4.1. Схема иерархического строения злокачественных опухолей, прогрессирования и метастазирования в соответствии с концепцией опухолевых стволовых клеток (по Sancho et al., 2016, с изменениями). Для различных солидных опухолей было показано, что клональная гетерогенность формируется опухолевыми стволовыми клетками и их дифференцированными потомками. В отсутствие повреждающих воздействий опухолевые стволовые клетки характеризуются низкой пролиферативной активностью, но сохраняют способность к асимметричному делению, в результате которого одна дочерняя клетка сохраняет свойства материнской, а вторая многократно делится и дает начало более дифференцированным клеткам с ограниченной или отсутствующей способностью к инициированию опухолей и метастазированию, несмотря на быструю пролиферацию последних. Опухолевые стволовые клетки эволюционируют вследствие генетических и эпигенетических изменений по мере прогрессирования опухоли. Хотя и опухолевые стволовые клетки, и остальные клетки могут приобретать повышенную подвижность, например вследствие эпителиально-мезенхимальной транзиции (EMT), существуют данные, что только метастатические опухолевые стволовые клетки инициируют метастазы

Несмотря на объективные сложности идентификации таких клеток и отсутствие универсальных маркеров ОСК, в настоящее время продемонстрировано их существование в злокачественных новообразованиях различных локализаций, включая глиобластому, меланому, рак легкого, верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, органов женской репродуктивной системы (молочной железы, яичника, тела и шейки матки), проста-

ты и др. За редким исключением ОСК составляют лишь очень малую часть опухолевой массы (обычно от 0,01 до 5%), что вносит дополнительные технологические сложности их обнаружения и исследования.

Исследование радиобиологических свойств ОСК охватывало широкий спектр указанных солидных опухолей и клеточных линий различного происхождения. Результаты многочисленных исследований (выполненных в основном *in vitro*) доказали более высокую резистентность ОСК к редкоионизирующему излучению и многим противоопухолевым препаратам по сравнению с остальной массой клеток (**рис. 4.2**) (Pajonk F. et al.,

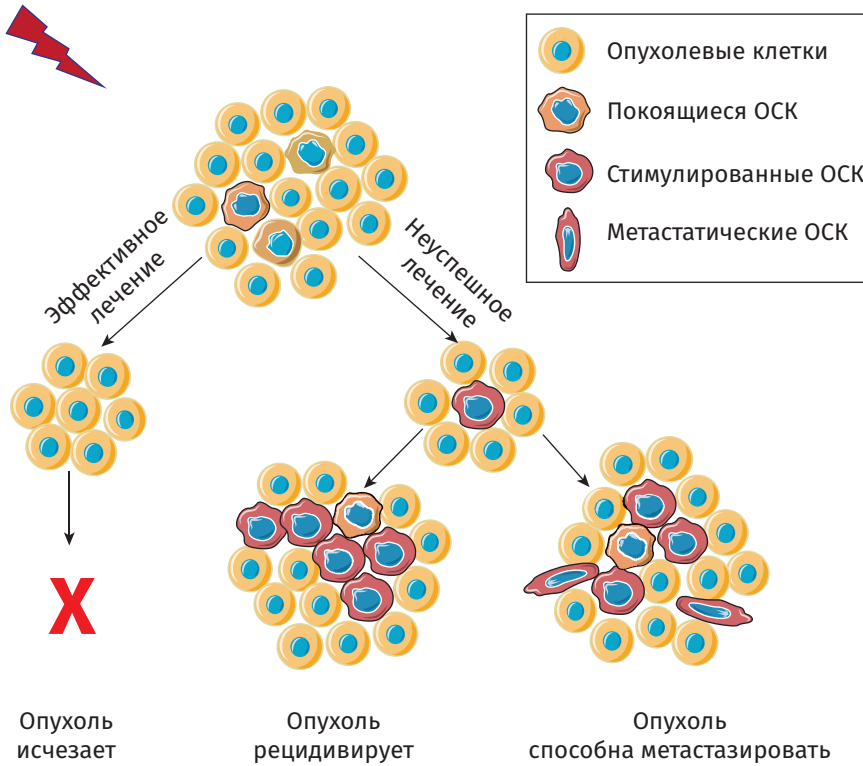

Рис. 4.2. Изменение пула опухолевых стволовых клеток в ответ на облучение и результаты лучевой терапии (по Liu et al., 2020, с изменениями). Опухоль исчезает, если удается уничтожить все опухолевые стволовые клетки. Неудачная лучевая терапия может стимулировать покоящиеся опухолевые стволовые клетки к вхождению в клеточный цикл, что в конечном итоге приводит к рецидивированию и метастазированию опухоли. Пополнение пула опухолевых стволовых клеток может осуществляться также и за счет дедифференцировки нестволовых клеток. ОСК — опухолевые стволовые клетки

2010; Matchuk O.N. et al., 2013;. Замулаева и др., 2014; Rycaj K., Tang D.G., 2014; Матчук О.Н. и др., 2019; Huang T. et al., 2020; Siqueira J.M. et al., 2023). Поэтому многие исследователи считают, что сохранение ОСК после лечения определяет неблагоприятные результаты лучевой и комбинированной терапии онкологических пациентов, включая возникновение рецидивов заболевания и метастазирование (Krause M. et al., 2017; Lytle N.K. et al., 2018; Zamulaeva et al., 2019). Кроме того, стало понятно, что при совершенствовании существующих или разработке новых методов ЛТ необходимо учитывать реакцию ОСК, а также необходимо создавать новые средства/способы элиминации пула ОСК или повышения их чувствительности к противоопухолевым воздействиям, в том числе радиационным. В основе этой работы лежит понимание механизмов радиорезистентности ОСК. В случае редкоионизирующего излучения, которое используется в традиционных схемах ЛТ, к таким механизмам прежде всего относятся:

- низкая пролиферативная активность ОСК, что позволяет им уклоняться от действия химиопрепаратов, нацеленных на быстропролиферирующие клетки, и избегать перераспределения по фазам клеточного цикла в ходе радиотерапии в стандартных режимах с использованием редкоионизирующих (γ-, рентгеновского) излучений, то есть миновать один из важных процессов, приводящих к повышению чувствительности к фракционированному облучению;
- высокая эффективность репарации повреждений ДНК, включая наиболее опасные для клеток ДР ДНК, которые возникают в результате действия ионизирующих излучений и многих химиопрепаратов;
- высокий уровень антиоксидантной защиты, который приводит к низкому количеству конститутивных/радиационно-индуцированных активных форм кислорода и в конечном итоге к относительно низкому количеству повреждений ДНК, возникающих вследствие непрямого действия радиации;
- особенности структурной организации хроматина, приводящие к относительно низкому количеству первичных радиационно-индуцированных повреждений ДНК;
- высокий уровень конститутивной и/или радиационно-индуцированной экспрессии и/или активности молекулярных шаперонов (белков теплового шока HSP90, HSP70, HSP40, HSP27, глюкозо-регулируемых белков GRP94, GRP78, GRP75 и др.) в ОСК по сравнению с остальными клетками, что приводит к снижению эффективности повреждающих воздействий;
- особая регуляция молекулярных путей клеточной гибели и выживания, выражающаяся, например, в снижении апоптоза из-за повы-

шенного содержания антиапоптотических белков, таких как Bcl-2, Bcl-X, c-FLIP, или ингибиторов апоптоза (IAP, XIAP) и усилении аутофагии как фактора выживания ОСК.

Взаимосвязанные механизмы более высокой радиорезистентности ОСК по сравнению с остальными опухолевыми клетками, по крайней мере частично, обеспечивают повышение доли ОСК после однократного и фракционированного воздействия рентгеновского и γ-излучений на клеточные культуры *in vitro*. Более того, показано, что длительное фракционированное облучение в суммарных дозах, соответствующих клиническому диапазону (50–70 Гр) и выше него (90 Гр), с успехом может быть использовано для получения радиорезистентных клеточных линий, обогащенных ОСК. Следует также отметить, что пострадиационное увеличение пула ОСК может являться следствием не только сохранения жизнеспособности этих клеток после облучения из-за вовлечения указанных выше механизмов, но также пролиферации этих клеток и, как стало понятно в последние годы, может быть следствием дедифференцировки нестволовых клеток под влиянием эпителиально-мезенхимальной транзиции, которая усиливается под воздействием ионизирующих излучений.

В связи с расширяющимся в последнее время использованием плотноионизирующих излучений в ЛТ интересно отметить, что чувствительность опухолевых стволовых и нестволовых клеток к такому воздействию не отличается, как показано в экспериментальных условиях *in vitro* и *in vivo* при облучении пучками нейтронов, ионов углерода или протонов в расширенном пике Брегга (Матчук О.Н. и др., 2012; Dini V. et al., 2020; Zamulaeva I.A. et al., 2023; Wang Q. et al., 2023; Schniewind I. et al., 2022).

Несомненно, регуляция пула ОСК в условиях *in vivo* до использования противоопухолевых воздействий и особенно после их применения — значительно более сложный процесс, чем в клеточных культурах *in vitro*, поскольку включает влияние множества сигнальных молекул (например, TGF-b1, FGF, IL-6, HIF, Wnt-лиганды и т.д.), секретируемых не только опухолевыми, но и различными стромальными клетками, в том числе эндотелиальными, иммунными клетками, опухоль-ассоциированными макрофагами, фибробластами, нормальными стволовыми клетками. Помимо клеточных и гуморальных факторов в формировании пула и биологических свойств ОСК участвуют такие физические факторы, как давление кислорода и pH внеклеточной среды, влияющие на чувствительность к действию редкоионизирующих излучений. Вклад этих факторов в резистентность ОСК к редкоионизирующим излучениям *in vivo* может быть весьма значителен, учитывая, что по крайней мере часть этих

клеток находится в гипоксических нишах, которые, с одной стороны, снижают повреждающее действие радиации, а с другой стороны, способствуют дедифференцировке нестволовых опухолевых клеток и пополнению пула ОСК.

Кроме того, установлено, что ОСК обладают повышенной способностью ускользать от иммунного надзора по сравнению с остальными опухолевыми клетками (за счет высокой экспрессии лиганда 1 рецептора программируемой гибели PD-L1), что также способствует выживанию ОСК после генотоксических воздействий и, по-видимому, снижает эффективность ЛТ. Взаимосвязь и вклад многочисленных факторов, влияющих на формирование пула ОСК *in vivo* и их радиочувствительность, до конца не выяснены. Более того, проблема усугубляется тем, что асимметричное деление ОСК приводит к возникновению переходной популяции частично дифференцированных клеток с градиентом устойчивости к различным терапевтическим воздействиям.

В любом случае для понимания радиационного ответа злокачественных новообразований (ЗНО) важно, что повышение доли ОСК после облучения происходит не только в условиях *in vitro*, но и *in vivo*, в том числе в ходе ЛТ онкологических пациентов с использованием стандартных схем облучения. Не менее важно также и то, что количество (плотность) ОСК до лечения и/или количественные изменения этой популяции в ходе ЛТ имеют прогностическое значение в отношении как ближайших, так и отдаленных результатов лечения ЗНО различной локализации (степени регрессии опухоли и безрецидивной выживаемости пациентов). Это обстоятельство обосновывает новые подходы к персонализированному лечению онкологических пациентов на основе учета радиобиологических свойств ОСК.

В последние годы по мере накопления информации о прогностическом значении ОСК и механизмах их резистентности к противоопухолевым воздействиям, включая редкоионизирующие излучения, отмечался всплеск интереса к разработке способов и средств направленной элиминации этой небольшой, но очень важной популяции опухолевых клеток (Dini V. et al., 2019; Olivares-Urbano M.A. et al., 2020; Dzobo K. et al., 2020; Mukai S. 2022; Wang Q. et al., 2023). Определенная часть исследований была посвящена поиску возможностей для повышения радиочувствительности ОСК, основные из которых перечислены на **рис. 4.3**. Как показывают результаты недавних исследований, популяция ОСК представляет собой гетерогенную группу клеток с различными молекулярными и функциональными характеристиками, для элиминации которой, по всей видимости, необходима комбинация различных методов лечения, нацеленных на различные мишени.

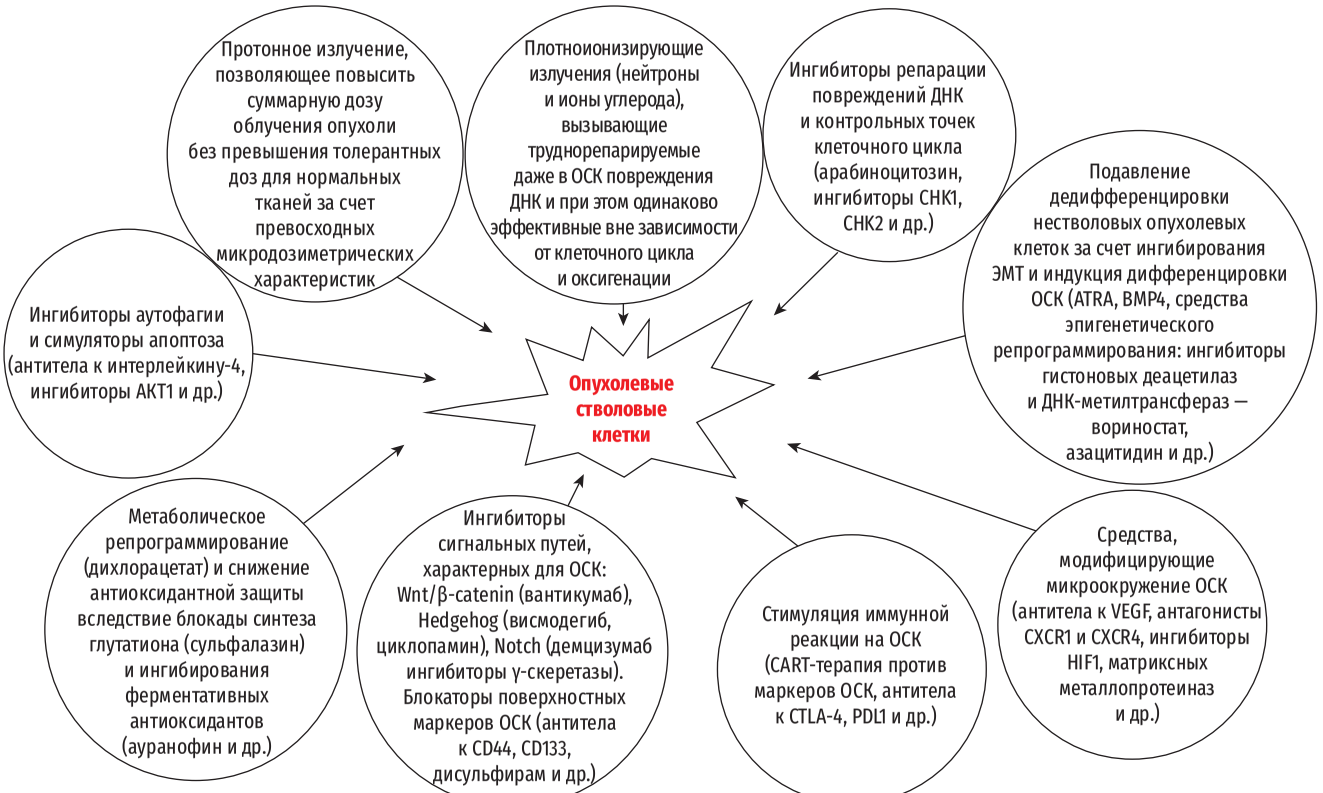

Рис. 4.3. Возможные пути повышения радиочувствительности и элиминации опухолевых стволовых клеток, сгруппированные по механизмам действия (часть из них успешно прошла клинические испытания, часть находится на стадии доклинических исследований)