

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России)
Отдел учебно-методической работы

**Арсеньев А. И., Новиков С. Н., Канаев С. В.,
Мельник Ю. С., Арсеньев Е. А., Нефедов А. О.,
Тарков С. А., Аристидов Н. Ю., Новиков Р. В.,
Рогачев М. В., Семилетова Ю. В.**

Радиобиология высокодозной лучевой терапии

Учебное пособие

Санкт-Петербург
2022

УДК:615.849.1(07)

ББК:53.6я7

Арсеньев А. И., Новиков С. Н., Канаев С. В., Мельник Ю. С., Арсеньев Е. А., Нефедов А. О., Тарков С. А., Аристидов Н. Ю., Новиков Р. В., Рогачев М. В., Семилетова Ю. В. Радиобиология высокодозной лучевой терапии: учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. – Санкт-Петербург: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2022. – 156 с.

ISBN 978-5-6048249-0-0

Рецензент: Правосудов И. В., д. м. н., профессор отдела учебно-методической работы отделения аспирантуры и ординатуры федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Учебное пособие посвящено основным проблемам радиобиологии и биологическому воздействию ионизирующих излучений, определяющих основы лучевой терапии, описывающих механизмы и процессы реакции нормальных и патологических тканей на облучение.

Учебное пособие предназначено для врачей-радиотерапевтов, врачей-радиологов, врачей-онкологов, для врачей, работающих с онкологическими больными, а также для обучающихся в системе высшего образования (аспирантура, ординатура, специалитет) и дополнительного профессионального образования (повышение квалификации и профессиональная переподготовка).

Утверждено
в качестве учебного пособия
Ученым советом ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
протокол № 8 от 17 мая 2022 г.

ISBN 978-5-6048249-0-0

©Арсеньев А. И. Коллектив авторов, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	6
Введение	11
Глава 1. Определения, понятия, классификации и основные дозиметрические величины	17
1.1. Прямое и непрямое воздействие излучения на молекулярном уровне	17
1.2. Радиобиологические эффекты	18
1.3. Термины	19
1.4. Качественная и количественная оценка излучения	23
1.5. Математическое описание механизмов воздействия ионизирующих излучений	24
1.6. Сравнение эффективности разных режимов облучения между собой	25
1.7. Клеточный цикл	25
Глава 2. Этапы развития радиобиологии, радиационной онкологии и технологий облучения	29
2.1. Исторические аспекты фракционирования	31
2.2. Эволюция технологии облучения, технологические этапы становления лучевой терапии	31
Глава 3. Стереотаксическая радиотерапия и радиохирurgia	34
3.1. Классификация стереотаксического высокодозного облучения	34
3.2. Эффективность СТЛТ	35
3.3. Терапевтический индекс (терапевтическое отношение)	37
3.4. Параллельные и последовательные органы	39
3.5. Факторы, определяющие токсичность SRS/SBRT/SABR	40
3.6. Лавинный феномен	42
3.7. Феномен радиационного отзыва	42
Глава 4. Радиочувствительность, принципы 4R/5R, основные эффекты облучения и влияние на них фракционирования	43
4.1. Типы клеточных повреждений, вызванных радиацией	43
4.2. Реакция различных органов и тканей на облучение	44
4.3. Принцип 4R/5R (repair + reoxygenation + redistribution + repopulation/ ± radiosensitivity) и влияние на них фракционирования	51
4.4. Постулаты 4R/5R в свете использования высокодозного облучения	55

Глава 5. Основные модели радиобиологии	61
5.1. Линейно-квадратичная модель (Linear-quadratic model – LQ-модель)	61
5.1.1. Модели выживания клеток и проблемы изоэффекта	61
5.1.2. Линейно-квадратичная модель и линейно-квадратичное уравнение	68
5.1.3. Соотношение α/β	69
5.1.4. Биологически эффективные дозы (Biologically Effective Doses – BEDs)	72
5.1.5. Модифицированные линейно-квадратичные модели при высокодозном облучении (Dose-Effect Relationship Models in SRS/SBRT/SABR)	73
5.1.6. Основные модификации ЛКМ	75
Глава 6. Роль сосудистых механизмов в реализации эффектов высокодозного облучения	81
6.1. Характеристики сосудистой сети и кровотока опухоли	82
6.2. Характеристики воздействия ЛТ на сосудистую сеть и кровотоков опухоли	85
6.2.1. Фракционированная лучевая терапия	85
6.2.2. Высокодозная лучевая терапия	86
6.2.3. Клиническое и экспериментальное обоснование	87
6.2.4. Клинические попытки модификации сосудистого ответа на облучение при комбинированном лечении	89
Глава 7. Иммунные механизмы в радиобиологии высокодозного облучения	92
7.1. Иммунные эффекты при проведении лучевой и химиолучевой терапии	93
7.2. Основные феномены модификации иммунного ответа на облучение	94
7.2.1. Усиленная облучением презентация антигенов (radiation-enhanced antigen presentation – REAP)	95
7.2.2. Индуцированные облучением DAMP (damage-associated molecular pattern – DAMP) сигналы, ассоциированные с клеточным повреждением (Radiation-Induced DAMP Signals)	98
7.2.3. Индуцированная облучением вирусная мимикрия (Radiation-Induced Viral Mimicry)	100
7.2.4. Иммуносупрессивные эффекты лучевой терапии (Immunosuppressive Properties of RT)	102

7.2.5. Уход опухоли (адаптивное уклонение) от иммунного ответа и радиорезистентность (Immune Evasion by Tumors and Radioresistance)	103
7.2.6. Иммуномодулирующие свойства лучевой терапии и их связь с дозами и фракционированием (Radiation as an Immunomodulatory Drug: Effect of Dose and Fractionation of RT)	106
Глава 8. Немишенные радиобиологические эффекты	110
Глава 9. Алгоритмы возможных сочетаний облучения с системным лечением (химиотерапией и иммунотерапией)	118
9.1. Классификация микроокружения опухоли (ТМЕ)	119
9.2. Лучевая терапия и химиотерапия	121
9.3. Лучевая (ЛТ) / химиолучевая (ХЛТ) и иммунотерапия (ИТ)	122
9.4. Иммунные контрольные точки	125
9.5. Основные направления исследований эффективности сочетания ЛТ/ХЛТ/ИТ	127
9.6. Клиническое обоснование возможностей сочетания лучевой / химиолучевой и иммунотерапии (ЛТ/ХЛТ/ИТ) на примере НМРЛ	128
9.7. Нерешенные вопросы комбинации лучевой терапии и иммунотерапии	130
Глава 10. Комплексная радиобиологическая модель	132
Контрольные вопросы	135
Тестовые задания	137
Список литературы	144

Список сокращений

3DCRT	– 3-dimensional conformal radiation therapy – 3DCRT (трехмерная конформная лучевая терапия)
AIM2	– absent in melanoma – «отсутствует при меланоме» (белок, участвующий в регулировании иммунного ответа)
ALR	– AIM2-like receptors (AIM2-подобные рецепторы)
APC	– antigen presenting cells (антиген-презентирующие клетки)
ASMase	– Acid sphingomyelinase (кислая сфингомиелиназа)
ATM	– Ataxia telangiectasia mutated [атаксия-телеангиэктазия (А-Т; син.: синдром Луи-Бар) аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене ATM]
ATP	– Adenosine triphosphate (аденозинтрифосфат – АТФ).
ATR	– ataxia-telangiectasia mutated Rad3 related
BED	– biologically effective dose (биологически эффективная доза)
bFGF	– Basic fibroblast growth factors (основные факторы роста фибробластов)
CAF	– cancer-associated fibroblasts (ассоциированные с опухолями фибробласты)
CAR-T	– chimeric antigen receptor expressing T (химерные антигенные рецепторы, экспрессирующие Т-клетки)
CRT	– Chemoradiotherapy (ХЛТ – химиолучевая терапия)
cCRT	– Concurrent chemoradiotherapy [одновременная (синхронная) химиолучевая терапия]
CSC	– Cancer stem cells (опухолевые стволовые клетки)
CTL	– cytotoxic T-cells (цитотоксические Т-клетки)
CTLA-4	– cytotoxic T-lymphocyt-associated antigen 4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4)
cGAS	– cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase (циклическая GMP-AMP (cGAMP) синтетаза)
cGAMP	– Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate
DAMP	– damage-associated molecular pattern (молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждением)
DC	– dendritic cells (ДК – дендритные клетки)
DNA	– Deoxyribonucleic acid (ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота)

DNA-ПК	– DNA-dependent protein kinase (ДНК-зависимая протеинкиназа)
dsDNA	– double strand DNA (двухцепочечная ДНК)
dsRNA	– double strand RNA (двухцепочечная РНК)
EBRT	– conventional fractionation external beam radiotherapy (обычная конвенциональная фракционированная лучевая терапия)
ECM	– extracellular matrix (внеклеточный матрикс)
ER	– endoplasmic reticulum (эндоплазматический ретикулум)
EUD	– equivalent uniform dose (эквивалентная равномерная доза)
Flt3L	– fms-like tyrosine kinase 3 ligand (fms-подобный лиганд тирозинкиназы 3)
gDNA	– genomic DNA (геномная ДНК)
Gu	– Gray (Гр – Грей – Грэй)
HERV-K	– Human endogenous retrovirus K (эндогенный ретровирус К человека)
HIF	– Hypoxia-inducible factors (факторы, индуцируемые гипоксией)
HMGB1	– high mobility group box 1 protein (белок 1-й группы высокой подвижности)
HR	– homologous recombination (гомологичная рекомбинация)
ICB	– immune checkpoint blockade (блокада иммунных контрольных точек)
ICAM-1/ CD54	– intercellular adhesion molecule 1 (молекула межклеточной адгезии 1)
ICD	– immunogenic cell death (иммуногенная гибель клеток)
IDO	– indoleamine 2,3-dioxygenase (индоламин-2,3-диоксигеназа)
IDP	– isotoxic dose prescription (назначенная изотоксическая доза)
IFN	– type I interferon (интерферон I типа)
INFAR	– interferon alpha and beta receptor 1 (альфа- и бета-рецепторы интерферона)
IRF3	– interferon regulatory factor 3 (регуляторный фактор интерферона 3)
IGRT	– image-guided techniques Radiation Therapy (лучевая

терапия, контролируемая по изображениям)

IMRT – intensity-modulated Radiation Therapy (лучевая терапия модулированная по интенсивности)

LC – local control (ЛК – локальный контроль)

LET – Linear Energy Transfer (линейный перенос энергии)

LFA-3/CD58 – lymphocyte function-associated antigen 3 (антиген-3, связанный с функцией лимфоцитов)

Linac – linear particle accelerator (линейный ускоритель частиц – ЛУ)

LQ – Linear quadratic (линейно-квадратичный)

MDSC – myeloidderived suppressor cells (миелоидные супрессорные клетки)

mtDNA – mitochondrial DNA (митохондриальная ДНК)

MHC – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)

MMEJ – microhomology-mediated end joining (микргомолотичное соединение концов ДНК)

NHEJ – nonhomologous end joining (негомолотичное соединение концов ДНК)

MLQ – modified LQ (модифицированная LQ модель)

NK – natural killer cell (естественные клетки-киллеры)

NOX2 – NADPH oxidase (НАДФН-оксидаза)

NSD – nominal standard dose (номинальная стандартная доза)

NTCP – normal tissue complication probability (вероятность осложнений в нормальной ткани)

OAR – organ-at-risk (органы риска)

OER – oxygen enhancement ratio (коэффициент кислородного усиления)

O₂ – Охуген – кислород.

PAMP – pathogen-associated molecular pattern (молекулярные фрагменты, ассоциированные с патогеном)

PD-L1 – programmed death ligand (лиганд 1 программируемой клеточной гибели)

PI3K – phosphatidylinositol 3 kinase (фосфатидилинозитол-3 киназа)

PRR – pattern recognition receptors (рецепторы распознавания образов)

RBE – Relative biological efficiency (относительная биоло-

гическая эффективность – ОБЭ)

REAP – radiation-enhanced antigen presentation (усиленная радиацией презентация антигенов)

RIBE – Radiation-Induced Bystander Effect (радиационно-индуцированный эффект свидетеля)

RIG-1 – retinoic acid-inducible gene (ген, индуцируемый ретиноевой кислотой)

RIPK3, RIP3 – receptor-interacting protein kinase 3 (рецептор, взаимодействующий протеинкиназой-3)

RLR – RIG-1-like receptors (рецепторы, подобные гену, индуцируемому ретиноевой кислотой)

RN – radionecrosis (радионекроз)

ROS – Reactive oxygen species (активные формы кислорода)

S1P – Sphingosine-1-phosphate (сфингозин-1-фосфат)

SAHP – senescence-associated heterochromatin foci (связанные со старением очаги гетерохроматина)

SABR – stereotactic ablative radiotherapy (стереотаксическая абляционная радиотерапия)

SABT – Stereotactic ablative brachytherapy (стереотаксическая абляционная брахитерапия)

SBRT – Stereotactic body radiotherapy (стереотаксическая лучевая терапия)

SCF – surviving cell fraction (выжившая клеточная фракция)

SDF-1 – stromal cell-derived factor-1 (фактор-1, производный от стромальных клеток)

SF – surviving fraction (фракция выживших клеток)

SF2 – surviving fraction after 2 Gy irradiation (фракция выживших клеток при облучении 2 Гр)

SIRPalpha – signal regulatory protein alpha (сигнал альфа-регуляторного белка)

SLDR – sublethal damage repair (восстановление сублетальных повреждений)

SM – Sphingomyelin (сфингомиелин)

SRS – Stereotactic radiosurgery (стереотаксическая радиохирургия)

STING – stimulator of interferon genes (стимулятор генов интерферона)

TAM – tumor-associated macrophages (ассоциированные с опухолью макрофаги)

TAP-2	– Transporters associated with Antigen Processing (транспортеры, связанные с обработкой антигена)
TBK1	– TANK-binding kinase 1 (TANK-связывающая киназа 1)
TCP	– tumor control probability (вероятность контроля опухоли)
TD	– Tolerance doses (толерантная доза)
TGFβ	– transforming growth factor beta (трансформирующий фактор роста бета)
TIL	– tumor-infiltrating lymphocytes (лимфоциты, инфильтрирующие опухоль)
TLR	– toll-like receptors (toll-подобные рецепторы)
TME	– tumor microenvironment (микроокружение опухоли)
TNFR1	– tumor necrosis factor receptor (рецептор фактора некроза опухоли)
TOR	– target of rapamycin (мишень рапамицина млекопитающих)
Tregs	– regulatory T cells (регуляторные Т-клетки)
TREX1	– three prime repair exonuclease 1 (экзонуклеаза первичной репарации 1)
USC	– Universal Survival Curve (универсальная кривая выживаемости)
USMB	– Ultrasound-stimulated microbubbles (микробузырьки, стимулированные ультразвуком)
VEGF	– Vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов)
VEGFR	– Vascular endothelial growth factor receptor (рецептор фактора роста эндотелия сосудов)
VMAT	– volumetric modulated arc therapy (лучевая терапия, модулированная по объёму)

Введение

Радиобиология (от лат. *radio* – излучать) – наука, изучающая биологическое действие ионизирующих излучений на живые организмы и их сообщества. Радиобиология обеспечивает и формирует концептуальный базис лучевой терапии (ЛТ), идентифицируя механизмы и процессы, которые лежат в основе реакции опухоли и нормальных тканей на облучение и позволяют объяснить происходящие явления (механизмы гипоксии, реоксигенации, репопуляции клеток опухоли, репарации повреждений ДНК).

Основная характеристика взаимодействия ионизирующего излучения со средой – это ионизационный эффект. Особенностью действия ионизирующих излучений на живые объекты является беспрецедентное несоответствие малой величины энергии, поглощенной биологическим объектом, и часто высокой степенью выраженности биологического эффекта, вплоть до гибели (основной радиобиологический парадокс). Независимо от вида ионизирующего излучения, тотальное облучение в дозе 7-10 Гр является смертельным для всех млекопитающих.

Воздействие ионизирующего излучения на биологические объекты генерирует последовательность процессов, которые могут быть разделены на три фазы.

1) **Физическая фаза** – включает взаимодействие между заряженными частицами и атомами, из которых состоит ткань. Движущемуся с большой скоростью электрону требуется $\sim 10^{-18}$ секунды для пересечения молекулы ДНК и $\sim 10^{-14}$ секунды, чтобы пройти через биологическую клетку. При движении в среде электрон взаимодействует в основном с орбитальными электронами, передавая им часть своей энергии. В результате эти вторичные электроны или вырываются из атома (процесс ионизации), или переходят на более высокий энергетический уровень внутри атома (процесс возбуждения молекул). Если вторичные электроны имеют достаточно энергии, то они, в свою очередь, начинают ионизировать другие атомы. При поглощенной дозе, равной 1 Гр, в объеме клетки диаметром 10 мкм образуется до 108 ионизаций.

2) **Химическая фаза** – процесс, в котором подвергнутые воздействию атомы и молекулы реагируют с другими компонентами

клетки в быстрых химических реакциях. Ионизация и возбуждение приводят к разрыву химических связей и образованию поврежденных («расколотых», разорванных) молекул – высокоактивных нестабильных радикалов, вовлекающихся в последовательную цепочку реакций за время ~ 1 мс.

3) **Биологическая фаза** включает процессы, которые начинаются с ферментных реакций. Подавляющая часть повреждений, например, в ДНК, успешно репарируется, но некоторые приводят со временем к гибели клетки. После получения повреждения клетка нередко может совершить несколько делений, прежде чем погибнет. При гибели стволовых клеток возникают ранние повреждения нормальных тканей (воспаление кожи, слизистых, эрозии в ЖКТ, повреждение кроветворных органов). Вторичный эффект заключается в компенсаторной пролиферации клеток из соседних областей. Поздние реакции, распространяющиеся на многие годы, включают фиброз и телеангиоэктазию кожи, повреждение спинного мозга и кровеносных сосудов, образование вторичных опухолей (радиационный канцерогенез) [1, 3, 4, 10, 60].

Радиобиологические эффекты – функциональные и морфологические изменения, развивающиеся в результате воздействия излучения, могут быть мишенными и немишенными. Мишенными возникают непосредственно в облученных клетках и могут быть детерминированными (определенными пороговой дозой) и стохастическими (вероятностными). Немишенными радиобиологические эффекты наблюдаются в клетках, которые не подвергались непосредственному радиационному воздействию и могут проявляться как радиационно-индуцированная геномная нестабильность, абскопальный эффект (bystander-effect), радиационный гормезис, адаптивный ответ, начальная гиперчувствительность и индуцированная радиорезистентность.

Основные понятия и постулаты радиационной биологии были разработаны до появления современных лучевых технологий, когда помимо мишени и нормальные ткани получали значительные дозы во время длительных курсов фракционированного облучения. К новым технологиям относятся IMRT (intensity-modulated radiation therapy – лучевая терапия, модулированная по интенсивности), IGRT (image-guided techniques radiation therapy – лучевая терапия, контро-

лируемая по изображениям) и VMAT (volumetric modulated arc therapy – объемно модулированная дуговая терапия, или лучевая терапия, модулированная по объёму).

Внедрение различных вариантов гипофракционирования, в том числе стереотаксической радиохирургии (stereotactic radiosurgery – SRS) и стереотаксической лучевой терапии (stereotactic body radiation therapy/ stereotactic ablative radiotherapy – SBRT/SABR) показало, что радиобиология опухоли и нормальных тканей при использовании этих методов не соответствует многим традиционным представлениям, характерным для классического фракционирования, а 4R/5R концепции радиобиологии не могут адекватно объяснить эффекты высокодозного облучения.

Опухолевый ответ на ионизирующее излучение реализуется посредством нескольких механизмов:

1) прямое цитотоксическое повреждение опухолевых клеток, вызванное повреждением ДНК, которое происходит как при низких, так и при высоких дозах на фракцию;

2) непрямая гибель опухолевых клеток, которой предшествует повреждение сосудов и эндотелиальных клеток, преимущественно при высоких дозах за фракцию;

3) непрямая гибель опухолевых клеток, за счет подключения иммунных механизмов;

4) реализация немимических механизмов смешанного генеза.

При высоких дозах облучения преобладает непрямая гибель опухолевых клеток, возникающая в результате ишемии после летального повреждения эндотелиальных клеток и разрушения микрососудов, что обеспечивает немедленную тяжелую сосудистую реакцию и последующее подключение иммунного ответа.

Механизмы реализации эффектов обычного и высокодозного облучения отличаются на всех этапах (разрывы ДНК, смерть клетки, апоптоз и некроптоз). Так, после SRS/SBRT/SABR в отличие от EBRT клетки погибают чаще по пути некроптоза, а не апоптоза. В отношении репарации – возможности восстановления клеток опухоли уменьшаются, а токсичность доставленной дозы увеличивается (особенность, связанная с квадратичным β -членом линейно-квадратного уравнения).

Крупные фракции (> 10 Гр) активируют быстрый эндотелиальный апоптоз за счет церамидного пути, приводя к массивному разрушению сосудов в опухолях, делая маловероятной реоксигенацию

гипоксических клеток в раннем периоде. Однако потребление кислорода может снизиться после последующей гибели значительного объёма опухоли, соответственно, выжившие гипоксические клетки могут подвергнуться повторной оксигенации. При проведении SBRT/SRS ускоренная доставка тумороцидных доз предотвращает опухолевую экспансию и репопуляцию, что особенно характерно для быстро делящихся опухолей. Уменьшение количества фракций увеличивает вероятность облучения когорты клеток, находящихся в радиочувствительной фазе. После высокодозного облучения (особенно 20 Гр и более за фракцию) клеточный цикл полностью блокируется на всех фазах, следовательно, перераспределение опухолевых клеток невозможно, поскольку как чувствительные, так и нечувствительные опухолевые клетки погибают. Различия в радиочувствительности опухолевых клеток имеют существенное значение при небольших разовых дозах, свойственных конвенциональному фракционированию. В то же время использование больших доз при SRS/SBRT показывает, что в экспоненциальной части кривой доза-ответ влияние индивидуальной радиочувствительности стирается. Крупные фракции и короткое время облучения предотвращают селекцию стволовых клеток, часто обнаруживаемых в солидных опухолях и наиболее устойчивых к радиации, благодаря усиленной репарации ДНК, вторичной по отношению к усилению функции контрольных точек клеточного цикла.

Технологии IGRT, SRS/SBRT за счет увеличения размеров фракций и лучшего распределения дозы в опухоли и нормальной ткани привели к несоответствиям при попытке идентифицировать биологически эквивалентные дозы обычного фракционирования с высокодозным облучением. Не существует согласованного мнения о том, до какого уровня дозы радиобиологические эффекты адекватно описываются традиционной линейно-квадратичной моделью. Диапазон таких доз по данным разных авторов составляет 3-5-6-10 Гр за фракцию. Был предложен ряд модифицированных моделей, устраняющих несоответствие изоэффектов обычного фракционирования с дозами, полученными с помощью SRS/SBRT. Однако, ни одна из них не может обеспечить точную оценку выживаемости клеток в диапазоне высоких доз. Кривые выживаемости клеток, на которые влияют эти параметры, значимо отклоняются от прогноза модифицированных линейно-квадратичных моделей, что во многом связано с косвенными эффектами, например, радиационно-индуцированными по-

вреждениями эндотелия сосудов, активацией иммунных и немишен-ных процессов. Эти модели следует с осторожностью использовать в клинической практике совместно с инструментами QUANTEC.

К сосудистым механизмам относятся:

- 1) прямое повреждение эндотелиальных клеток микрососудов;
- 2) опосредованное воздействие через радиоиндуцированные немишенные эффекты;
- 3) взаимодействие между радиорезистентными опухолевыми стволовыми клетками и эндотелиальными клетками.

Основными феноменами модификации иммунного ответа на облучение являются:

- 1) усиленная облучением презентация антигенов;
- 2) индуцированные облучением DAMP сигналы, ассоциированные с клеточным повреждением;
- 3) индуцированная облучением вирусная мимикрия;
- 4) иммуносупрессивные эффекты лучевой терапии;
- 5) уход опухоли от иммунного ответа и радиорезистентность;
- 6) облучение, как иммуномодулирующее средство, характер которого определяется дозой и фракционированием (иммуноаблятивное облучение – высокие дозы, иммуномодулирующее – средневысокие дозы и модулирующее микроокружение опухоли – низкие дозы).

Модель немишенных эффектов описывается на стыке основных моделей радиобиологии: линейно-квадратичной, сосудистой и иммунной и включает радиационно-индуцированную геномную нестабильность, абскопальный эффект и «эффект свидетеля», радиационный гормезис, адаптивный ответ, начальную гиперчувствительность и индуцированную радиорезистентность.

Таким образом, в широкой трактовке на современном этапе описание основных понятий и постулатов радиационной биологии можно свести к нескольким взаимосвязанным моделям:

1. Линейно-квадратичная модель (linear-quadratic model – LQ) выживания клеток и ее модифицированные варианты.
2. Сосудистая модель.
3. Радиоиммунобиологическая модель.
4. Модель немишенных эффектов (описывается на стыке линейно-квадратичной, сосудистой и иммунной моделей).

Каждая из этих моделей описывает свое звено совокупного ответа опухоли и нормальных тканей на проводимое облучение.

Очевидно, что назрела необходимость создания единой комплексной модели, объединяющей предыдущие и максимально адекватно отражающей все механизмы реализации эффекта лучевой терапии, особенно высокодозного облучения.

Доказано, что совместное использование ионизирующего излучения, системной терапии и иммунотерапии может генерировать противоопухолевый иммунитет за счет воздействия на все звенья противоопухолевого ответа:

- 1) повреждение ДНК;
- 2) сосудистые факторы;
- 3) индукция иммуногенной гибели клеток;
- 4) модуляция микроокружения опухоли;
- 5) включение немишенных механизмов.

Комбинированные методы лечения могут быть нацелены на каждый из этих этапов в отдельности, или сразу на несколько звеньев. Синергические эффекты двойной или тройной комбинации являются предметом многочисленных исследований. Можно пытаться усилить опухолеспецифические иммунные реакции для каждого конкретного пациента с учетом дозы и фракционирования ЛТ, типов иммунотерапевтических агентов и базового иммунофенотипа опухоли.

В связи с тем, что в иностранной и русскоязычной литературе существуют определенные терминологические разночтения, часть названий и определяющих формулировок в пособии дублируется на английском языке.

Глава 1.

Определения, понятия, классификации и основные дозиметрические величины

Рассмотрим определения, понятия, классификации и основные дозиметрические величины.

1.1. Прямое и не прямое воздействие излучения на молекулярном уровне

В основе первичных радиационно-химических изменений молекул могут лежать два механизма:

1) прямое действие, когда в молекулах происходят изменения (ионизация, возбуждение) непосредственно при взаимодействии с излучением. На клеточном уровне излучение непосредственно воздействует на молекулы ДНК в ткани-мишени. Прямая ионизация атомов в молекулах ДНК является результатом поглощения энергии за счет фотоэлектрического эффекта и комптоновских взаимодействий. Если поглощенной энергии достаточно для удаления электронов из молекулы, связи нарушаются, что может привести к разрыву одной или обеих нитей ДНК. В первом случае чаще происходит восстановление ДНК, во втором – гибель клетки.

2) не прямое (косвенное) действие, когда молекула непосредственно не поглощает энергию ионизирующего излучения, а получает ее путем передачи от другой молекулы, радикала или иона. На клеточном уровне не прямое воздействие излучения на молекулы включает образование свободных радикалов, их взаимодействие с ДНК и возникающее в результате молекулярное повреждение. Это явление во многом связано с взаимодействием излучения с молекулами воды. Свободные радикалы – это электрически нейтральные атомы, которые содержат «свободные» (т.е. несвязанные) электроны. Они обладают высокой электрофильностью и реакционной способностью. Прямое действие излучения ответственно за 10-20% лучевого поражения, а косвенное – за 80-90%, при этом они не суммируются, а усиливают одно другое [2, 3, 4].

1.2. Радиобиологические эффекты

Радиобиологические эффекты – это функциональные и морфологические изменения, развивающиеся в организме в результате воздействия на него излучения, зависящие от вида и интенсивности облучения, с реализацией эффектов в несколько этапов. По механизмам формирования они могут быть мишенными и немишенными.

Мишенные радиобиологические эффекты возникают непосредственно в облученных клетках и могут быть детерминированными и стохастическими [6].

1. *Детерминированные эффекты*, или «тканевые реакции» по новой терминологии международной комиссии по радиационной защите (МКРЗ/ICRP – International Commission on Radiological Protection) – неизбежные, клинически выявляемые вредные биологические эффекты, возникающие при облучении, в основном, большими дозами, в отношении которых предполагается существование порога, ниже которого эффект отсутствует. Степень проявления эффекта зависит от дозы. Возникает, когда число клеток, погибших в результате облучения, потерявших способность воспроизводства или нормального функционирования, достигает критического значения, при котором заметно нарушаются функции пораженных органов. Детерминированные эффекты подразделяются на: а) ближайшие последствия (острая, подострая и хроническая лучевая болезнь; локальные лучевые повреждения: лучевые ожоги кожи, лучевая катаракта и стерилизация) и б) отдалённые последствия (радиосклеротические процессы, радиоканцерогенез, радиокатарактогенез и прочие). Хроническое облучение действует слабее чем однократное в той же дозе в связи с процессами репарации. Ориентировочным порогом возникновения детерминированных эффектов для людей является разовая доза примерно в 0,25 Зв (с поправкой на индивидуальные особенности организма и сопутствующие факторы).

2. *Стохастические (вероятностные эффекты)* – это вредные биологические эффекты излучения, не имеющие дозового порога возникновения, вероятность их возникновения пропорциональна дозе, а тяжесть проявления не зависит от дозы. С увеличением дозы повышается не тяжесть этих эффектов, а вероятность (риск) их появления. Согласно консервативной радиобиологической гипотезе, любой сколь угодно малый уровень облучения несет определённый

риск возникновения стохастических эффектов. Они делятся на соматостохастические (лейкозы и опухоли различной локализации), генетические (доминантные и рецессивные генные мутации, хромосомные aberrации) и тератогенные эффекты (умственная отсталость, другие уродства развития; возможен риск возникновения рака и генетических эффектов облучения плода).

Немишенные радиобиологические эффекты наблюдаются в клетках, которые не подвергались непосредственному радиационному воздействию [6].

1. *Радиационно-индуцированная геномная нестабильность* – биологические эффекты (мутации, хромосомные aberrации и изменения в экспрессии генов) возникают у дальних потомков облученных клеток [6].

2. *Абскопальный эффект и его частный случай – «эффект свидетеля» («эффект соседа», «bystander-effect»)* – биологические эффекты в смешанной популяции облученных и необлученных клеток возникают в клетках, которые не подвергались непосредственному радиационному воздействию.

3. *Радиационный гормезис* – благоприятное воздействие малых доз облучения (термин предложен в 1980 году Т. Д. Лакки).

4. *Адаптивный ответ.*

5. *Начальная гиперчувствительность.*

6. *Индукцированная радиорезистентность* [6].

1.3. Термины

Рассмотрим основные термины и понятия, применяемые в радиобиологии.

Флюенс и плотность потока. Флюенс фотонов (Φ) – отношение количества фотонов dN , входящих в объем элементарной сферы, к площади поперечного сечения сферы dA : $\Phi = dN/dA$, см^{-2} . Плотность потока фотонов ϕ – флюенс фотонов за единицу времени: $\phi = d\Phi/dt$, $\text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Керма «К» – отношение суммы первоначальных кинетических энергий заряженных частиц dE_{tr} , образованных при взаимодействии

фотонов с веществом в элементарном объеме, к массе этого объема dm .

Поглощенная доза (absorbed dose) – понятие, близкое к керме – величина энергии ионизирующего излучения, переданная веществу, т.е. отношение средней энергии dE , поглощенной в элементарном объеме среды, к массе dm этого объема: $D=dE/dm$. Выражается как отношение энергии излучения, поглощённой в данном объёме, к массе вещества в этом объёме. В Международной системе единиц (СИ) поглощенная доза измеряется в джоулях, деленных на килограмм (Дж/кг), и имеет специальное название – грей (русское обозначение – Гр; международное – Gy; $1 \text{ Гр} = 1 \text{ Дж} / 1 \text{ кг} = 1 \text{ м}^2 / \text{с}^2$). Ранее использовалась внесистемная единица *rad* (rad, от англ. radiation absorbed dose). $1 \text{ рад} = 100 \text{ эрг} / \text{г} = 0,01 \text{ Дж} / \text{кг} = 0,01 \text{ Гр}$. Не отражает биологический эффект облучения.

Экспозиционная доза (в ЛТ ее часто называют экспозицией) определяется как отношение полного количества ионов одного знака dQ , образующихся в элементарном объеме воздуха после завершения всех процессов ионизации, к массе dm этого объема. $X=dQ/dm$. Единицей измерения экспозиционной дозы в СИ является кулон на килограмм, Кл/кг. Внесистемной, часто используемой единицей является рентген ($1 \text{ Р} = 2,58 \times 10^{-4} \text{ Кл} / \text{кг}$).

Концепция «доза в небольшой массе вещества, находящегося в воздухе» (Dвещ), известная также как «доза в свободном пространстве» (Df.s.), была введена в лучевой терапии для характеристики «выхода» (output) установки для облучения и определения опорной (или ссылочной) дозы для дозиметрических вычислений, включающих «отношение ткань – воздух» и «фактор – пиковое рассеяние». Доза D основана на измерении кермы в воздухе. Концепция получила широкое распространение для ортовольтовых облучателей и Со-60 установок, но в мегавольтовом диапазоне применяется значительно реже [2, 3, 4].

Эквивалентная доза (Equivalent dose). Излучения вызывают различные повреждения в биологических тканях. Для их описания средняя поглощенная доза умножается на взвешивающий (весовой) коэффициент излучения (weighting factor – W_R), учитывающий отно-

сительную биологическую эффективность различных видов радиации, при этом определяется эквивалентная доза (H_T). Единицы измерения – зиверт (Зв, Sv), миллизиверт (мЗв, mSv) и микрозиверт (мкЗв, μ Sv). Величина 1 Зв равна эквивалентной дозе любого вида излучения, поглощённой в 1 кг биологической ткани и создающей такой же биологический эффект, как и поглощённая доза в 1 Гр фотонного излучения. Через другие единицы измерения СИ зиверт выражается следующим образом: $1 \text{ Зв} = 1 \text{ Дж/кг} = 1 \text{ м}^2/\text{с}^2$ (для излучений с коэффициентом качества, равным 1,0). Внесистемной единицей измерения эквивалентной дозы является бэр (до 1954 года – биологический эквивалент рентгена, после 1954 года – биологический эквивалент рада). $1 \text{ Зв} = 100 \text{ бэр}$.

Эффективная эквивалентная доза ($D_{\text{эфф}}$) – это величина, используемая для оценки меры риска возникновения отдаленных последствий облучения всего тела человека и его отдельных органов или тканей с учетом их радиочувствительности; рассчитывается она путем умножения эквивалентной дозы на соответствующий коэффициент радиационного риска (WT) и последующего суммирования по всем тканям и органам. Взвешивающие коэффициенты для тканей и органов (WT) – безразмерные множители, на которые умножаются накопленные в органах и тканях эквивалентные дозы, чтобы оценить вклад облучения данного органа или ткани в общий вред здоровью. Используются при расчёте эффективной дозы в радиационной безопасности для учёта чувствительности разных органов и тканей в возникновении стохастических эффектов радиации. Значения WT считаются независимыми от вида и энергии излучения; зависимость эффективной дозы от этих параметров характеризуется взвешивающими коэффициентами излучения WR, применяемыми при пересчёте от поглощённой дозы (непосредственно измеряемой в эксперименте величины) к эквивалентной дозе.

Линейный перенос энергии (LET – Linear Energy Transfer) – энергия, передаваемая ткани ионизирующим излучением на единицу длины траектории. LET является функцией заряда и скорости ионизирующего излучения, увеличивается по мере увеличения заряда ионизирующего излучения и уменьшения его скорости. LET определяется как отношение полной энергии dE , переданной веществу частицей вследствие столкновений на пути dl , к длине этого пути: $L =$

dE/dl. Для незаряженных частиц LET не применяется, но используются значения LET их вторичных заряженных частиц, образующихся в веществе. Значения LET меняется от 0,2 для высокоэнергетических фотонов до 104 эВ/нм для осколков деления ядер урана. Летальные эффекты увеличиваются по мере увеличения LET. Единица измерения – эВ/нм, keV/μm. Понятие широко используется в радиобиологии при оценке эффектов от различных типов излучений.

Толерантная доза (Tolerance doses – TD 5/5) – минимальная переносимая доза, при которой частота тяжелых лучевых осложнений при стандартном фракционировании не превышает 5% при пятилетнем сроке наблюдения.

Толерантная доза (TD 50/5) – максимальная переносимая доза, приводящая к частоте осложнений 50% в течение 5 лет.

Номинальная стандартная доза (НСД) – условная единица толерантности «универсальной» ткани при однократном облучении. Стандартное значение НСД – 1800 ед. количественно характеризует толерантность кожи, т.к. данная величина была получена на основе анализа результатов рентгенотерапии рака кожи. При этом значении вероятность риска лучевых повреждений здоровых тканей не превышает 5% при площади облучения 100 см².

Путем алгебраических преобразований НСД были разработаны две другие системы расчета изоэффективных доз:

- 1) кумулятивный радиационный эффект (КРЭ),
- 2) ВДФ (время-доза-фракционирование).

Параметр время-доза-фракционирование - ВДФ – служит для количественной оценки эффекта облучения по критерию предельной толерантности нормальной соединительной ткани и кожи. Он позволяет: сравнить различные режимы фракционирования дозы; определить изоэффективные дозы для различных схем фракционирования; учесть перерывы в облучении; планировать параметры внутриволнового/внутрипросветного облучения (суммарную поглощенную дозу, время облучения, мощность дозы облучения).

Концепция была создана путем математической интерпретации результатов клинических наблюдений и радиобиологических экспериментов.

Формула расчёта:

$$\text{ВДФ} = Nd^{1,538}(T/N)^{-0,169} 10^{-3},$$

где: d – разовая доза облучения здорового органа (сГр), T – длительность курса лечения (сутки), N – число фракций облучения. Предельное значение ВДФ составляет 100 единиц. Критерий ВДФ можно использовать при любых условиях облучения – при расщепленном курсе, при разных методах (дистанционная и контактная) лучевой терапии. Он является универсальной величиной, учитывающей дозу на орган, условия фракционирования, условия облучения, длительность курса.

Кумулятивный радиационный эффект (КРЭ) позволяет проводить количественную оценку постепенного накопления эффекта облучения в нормальной соединительной ткани. Он основан на клеточно-кинетической модели и программе расчета относительного числа выживших клеток для любой ткани при разных условиях фракционирования. Величина КРЭ выражается через ВДФ.

Формула расчёта:

$$\text{КРЭ} = (\text{ВДФ} \times 10^3)^{0,65}, \text{ или } \text{КРЭ} = \Phi \times qD(T/N)^{0,11} N^{0,65},$$

где Φ – поправочный коэффициент для учета объема облучения; q – коэффициент относительной биологической эффективности; единицей КРЭ является ерэ – единица радиационного эффекта; Толерантность кожи и соединительной ткани определяется величиной $\text{КРЭ} = 1800$ ерэ, что соответствует величине ВДФ, равной 100. Существуют кривые значений КРЭ в зависимости от числа фракций и разовой дозы при облучении 2-5 раз в неделю. С помощью коэффициента снижения $K_{сн} = e^{-0,003Tn}$ можно учесть снижение КРЭ за счет частичного восстановления поврежденных тканей, зная время перебива в лечении.

1.4. Качественная и количественная оценка излучения

С точки зрения качества все ионизирующие излучения, используемые в ЛТ, разделяют на три класса:

1) гамма-излучение радионуклидов, тормозное излучение, создаваемое в линейных ускорителях электронов (ЛПУЭ – linear particle accelerator – linac) и электроны;

2) легкие частицы, включающие протоны, нейтроны и α -частицы;

3) тяжелые частицы, включающие ионы углерода, неона, кремния или аргона.

Для количественной оценки излучения введено понятие относительной биологической эффективности (ОБЭ – Relative biological efficiency – RBE). Эта величина определяется следующим образом: ОБЭ = Доза от стандартного излучения/Доза от тестируемого излучения; где обе величины дозы приводят к одинаковому биологическому эффекту. За стандартное излучение обычно берется рентгеновское излучение 250 кВ. Одной из главных причин разницы в значениях ОБЭ является различие в LET.

1.5. Математическое описание механизмов воздействия ионизирующих излучений

Зависимость между дозой радиации и степенью выраженности радиобиологического эффекта графически характеризуют построением кривой дозовой зависимости. Кривые, имеющие плечо, описываются уравнением вида:

$$\frac{N}{N_0} = 1 - \left(1 - e^{-\frac{D}{D_0}}\right)^n,$$

где N – число выживших из общего (N_0) числа клеток; D – доза излучения; n – экстраполяционное число, определяемое как значение ординаты в месте ее пересечения экстраполированным прямолинейным участком кривой выживания. **Плечо на кривой выживания (плечо репарации)** определяет способность клеток к репарации. Мерой способности клеток к репарации является величина плеча, оцениваемая квазипороговой дозой D_q (на уровне 100% выживаемости).

Для количественного анализа радиобиологических эффектов используются принцип попадания и концепция мишени. В 1924 г. Дж. Кроутер сформулировал теорию попадания. Считая попаданием возникновение акта ионизации в облучаемом объеме, он предположил, что регистрируемый эффект связан с некоторым критическим числом ионизаций (попаданий) в пределах мишени, занимающей определенный чувствительный объем внутри клетки. Параметры мишени оказались сопоставимы с размерами центриолей и ядрышек. С тех пор в радиобиологии начался активный поиск мишени на основании статистических принципов попадания, который привёл к выводу о ведущей роли ядра и внутриядерных наследственных структур в летальном поражении клетки.

По принципу попадания полученные в эксперименте кривые «доза-эффект» интерпретируются на основании следующих физических положений [2, 3, 4]:

- ионизирующие излучения переносят энергию в дискретном виде;
- акты взаимодействия (попадания) не зависят друг от друга и подчиняются пуассоновскому распределению;
- исследуемый эффект наступает, если число попаданий в некоторую чувствительную область гетерогенной биологической структуры, так называемую мишень, составляет по крайней мере $n \geq 1$.

1.6. Сравнение эффективности разных режимов облучения между собой

Сравнение эффективности разных режимов облучения между собой. Простейший способ состоит в пересчете данных (использующих различные разовые и общие дозы) в параметры режима облучения с РОД=2 Гр, который давал бы такой же эффект.

$$EQD_2 = D \frac{d + (\alpha/\beta)}{2 + (\alpha/\beta)}$$

где EQD_2 – доза, полученная при облучении фракциями по 2 Гр и по эффекту эквивалентную суммарной дозе D , назначенной в режиме облучения с разовой дозой d Гр. Параметр EQD_2 идентичен нормализованному значению общей дозы (NDT).

1.7. Клеточный цикл

Поддержание объема и функций нормальных обновляющихся тканей тела зависит от существования небольшого количества стволовых клеток, имеющих неограниченную пролиферативную способность, что лежит в основе иерархии клеток и восполнении эпителиальных и кроветворных тканей организма. Злокачественные опухоли образуются из иерархических тканей, и гистологическое свидетельство этому вытекает из факта, что опухоли часто поддерживают многие функции дифференцированных тканей, внутри которых они возникают. Высокодифференцированным опухолям это свойственно в большей мере, чем анапластическим. В злокачественных новообразованиях имеются как опухолевые стволовые клетки, так и находя-

щиеся в необратимом процессе дифференциации, а также нормальные клетки, в том числе составляющие строму (фибробласты, эндотелиальные клетки, макрофаги и др.). Если в результате лечения останутся неповрежденными только незлокачественные клетки, то опухоль перестанет прогрессировать. Каждый грамм опухоли может содержать $\sim 10^9$ клеток, из которых порядка 1% являются клонообразующими. Главным фактором, определяющим успех ЛТ, следует считать величину дозы излучения. Низкие дозы являются неэффективными, если же имеется возможность дать очень высокую полную дозу, то, в принципе, любая опухоль может стать локально контролируемой. Между этими двумя полярными феноменами находится концепция вероятности контроля над опухолью (tumor control probability – ТСП), которая имеет сигмоидальную зависимость от дозы. Для любого конкретного злокачественного новообразования характеристики этой кривой являются решающими для успеха ЛТ. К таким характеристикам относятся положение кривой ТСП на дозовой оси и крутизна кривой.

Жизнь клетки принято разделять на четыре фазы: рождение при митозе, период синтеза ДНК, известный как S-фаза, ей предшествует G1-фаза, и за S-фазой следует G2-фаза. Радиочувствительность клеток существенно изменяется по мере прохождения ими клеточного цикла.

В течение своей жизни клетка демонстрирует длительный период или фазу (интерфазу), в течение которой не происходит деления, и фазу деления (митоз). Это называется клеточным циклом. Клеточный цикл повторяется на каждой клеточной стадии, и продолжительность времени, соответствующая клеточному циклу, зависит от типа клетки. В некоторых клетках интерфаза очень длинная, и эти типы клеток не делятся в течение жизненного периода организма (нейрон).

Митоз – это деление клетки на две путем сопряжения ее генома. Митоз наблюдается только в эукариотических клетках. Соматические клетки образуются путем митоза, тогда как половые клетки образуются путем мейотического деления [15].

Стадии митоза

1. Профаза. Ядерная мембрана и эндоплазматический ретикулум исчезают. Хромосомы укорачиваются и утолщаются. Центросомы движутся к противоположным полюсам. Ядрышко исчезает. Ячейки веретена формируются от полюсов к центру.

2. Метафаза. Хромосомы укорачиваются и утолщаются еще больше. Сестринские хроматиды удерживаются вместе с помощью центромер. Хромосомы расположены рядом в ряд в экваториальной плоскости. Хромосомы удерживаются на веретенообразных клетках своими центромерами.

3. Анафаза. Движения сокращения и расслабления веретенообразных клеток разрушают центромеры, которые скрепляют хроматиды вместе. Сестринские хроматиды отделяются друг от друга и перемещаются к противоположным полюсам.

4. Телофаза. Хромосомы перестают двигаться. Хромосомы раскручивают свои спирали и становятся хроматинами. Снова появляется ядрышко. Начинается синтез РНК и белка. Веретенообразные клетки исчезают. Образуется ядерная мембрана, и эндоплазматический ретикулум снова принимает форму, возобновляются жизненно важные события, цитогенез, и деление завершается.

Интерфаза – длительный период или фаза, в течение которой не происходит деления клеток. Интерфаза (промежуточная и самая длинная фаза эукариотического клеточного цикла) – это время подготовки к повторному делению разделенной клетки. Интерфаза делится на три этапа.

Стадии интерфазы

1 этап. G1 → (G: Gap1). Начинается сразу после цитогенеза, метаболически интенсивный. Это самая длинная стадия, на которой транспортировка вещества, синтез, реакции лизиса, образование органелл, РНК и функции тканей продолжают на самом высоком уровне. Происходит рост делящихся клеток. Клетки, которые теряют способность делиться, продолжают выполнять свои функции и жизнедеятельность (например, мышечные и нервные клетки).

2 этап. S → (S: Синтез). ДНК дублируется, и количество хроматидов удваивается (→ репликация). На этом этапе происходит наиболее интенсивный синтез белка. Дублирование центромеры.

3 этап. G2 → (G: Gap2). Синтезируются ферменты, связанные с делением. Количество органелл увеличивается. Синтез ДНК заканчивается, а РНК – продолжается. Синтез центросом заканчивается, и эти центросомы начинают двигаться к противоположным полюсам.

G0 фаза. Клетки временно прекращают свою клеточную активность и обладают естественным механизмом защиты, некоторые ге-

ны в ДНК покрыты различными белками; т.е. ДНК запрограммирована.

Радиочувствительность клетки во время митоза в 4 раза выше, чем во время интерфазы. Наиболее радиочувствительными фазами клеток являются поздние G2 и M. Радиорезистентность высока в фазах S, поздних G1 и G0. Устойчивость S-фазы обусловлена присутствием большого количества синтезирующих ферментов, которые обладают способностью быстро восстанавливать ДНК [15].

Главные контрольные точки (checkpoint) клеточного цикла

1. Первая контрольная точка клеточного цикла – в конце фазы G1, непосредственно перед фазой S. ДНК и внеклеточные сигналы, специфичные для синтеза ДНК, не должны иметь ошибок. При обнаружении повреждений (проверка белка p53) происходит апоптоз – программируемая гибель клетки.

2. Вторая контрольная точка находится непосредственно перед фазой M. Ингибиторы клеточного цикла останавливают клеточный цикл до определения идеальных генетических копий ДНК. Если репликация ДНК не завершается полностью и правильно, или все белки, веретенообразные клетки и другие материалы, необходимые для митоза, не сформированы адекватно, клеточный цикл останавливается до полного исправления ошибок. Затем осуществляется переход в фазу M.

Глава 2. Этапы развития радиобиологии, радиационной онкологии и технологий облучения

Исторически, уже в следующем году после открытия X-лучей в 1895 году В.К. Рентгеном (Röntgen W.C.), начаты попытки их использования в онкологии. В 1896 году французский физик Анри Беккерель (Becquerel Henri) выявил аналогичные излучения от природных веществ – соединений элемента урана – которые не требовали внешнего источника энергии. Еще год спустя Пьер и Мария Кюри (Curie Pierre and Marie) идентифицировали некоторые элементы, ответственные за явление «радиоактивности», включая радий, торий и полоний. Уже с самого начала был признан фундаментальный принцип ЛТ – концепция терапевтического соотношения, подхода «риск против пользы».

- 1895 г. Открытие рентгеновских лучей Вильгельмом Конрадом Рентгеном (Wilhelm Conrad Roentgen, Германия).
- 1895 г. Использование рентгеновских лучей при лечении рака молочной железы Эмилем Граббе (Emil Grubbe, США).
- 1896 г. Применение рентгеновских лучей при лечении рака носоглотки и для облегчения боли Фойгтом Й. Эцтлихером Верейн (Voigt J. Ärztlicher Verein, Германия).
- 1896 г. Открытие естественной радиоактивности Анри Беккерелем (Henri Becquerel, Франция).
- 1896 г. Использование рентгеновских лучей при лечении рака желудка Ф.В. Деспеньем (François Victor Despeignes, Франция).
- 1896 г. Применение рентгеновских лучей при лечении рака кожи Леопольдом Фрейндом (Léopold Freund, Австрия).
- 1897 г. Открытие электронов Д.Д. Томпсоном (Joseph John Thomson, Великобритания).
- 1898 г. Открытие радия Пьером и Марией Кюри (Pierre and Marie Curie, Франция).
- 1899 г. Определение альфа-частицы Э. Резерфордом (E. Rutherford, Великобритания).
- 1901 г. Первое применение радия в брахитерапии рака кожи – А. Данлос (Henri Danlos, Франция).
- 1903 г. Первые публикации, показывающие эффективность лучевой терапии при лимфоме – В.А. Пьюзи и Н. Сенн (William Allen Pusey и Nicolas Senn, США).

- 1905 г. Открытие чувствительности семиномы к радиации – А. Беклер (A. Bécèle, Франция).
- 1905 г. Открытие фотоэлектрического эффекта А. Эйнштейном (A. Einstein, Германия).
- 1906 г. Открытие характеристических рентгеновских лучей – Ч.Г. Баркла (Charles Glover Barkla, Великобритания).
- 1922 г. Демонстрация эффекта Комптона Артуром Х. Комптоном (Arthur Holly Compton, США).
- 1931 г. Первый циклотрон – Эрнест О. Лоуренс (Ernest O. Lawrence, США).
- 1932 г. Открытие нейтронов – Джеймс Чедвик (Sir James Chadwick, Великобритания).
- 1934 г. Открытие искусственных радиоэлементов Ирен и Фредерик Жолио-Кюри (Irène and Frédéric Joliot-Curie, Франция).
- 1934 г. 23% случаев излечения от рака головы и шеи при использовании лучевой терапии, описанные Анри Кутар (Henri Coutard, Франция).
- 1934 г. Смерть Марии Кюри из-за лучевой злокачественной анемии (миелодисплазии) (Marie Curie, Франция).
- 1940 г. Первый бетатрон – Дональд У. Керст (Donald William Kerst, США).
- 1951 г. Первый аппарат для лучевой терапии кобальтом-60 – Гарольд Э. Джонс (Harold E. Johns, Канада).
- 1952 г. Первый линейный ускоритель (linac) – Генри С. Каплан (Henry S. Kaplan, США).
- 1968 г. Применение гамма-ножа – Ларс Лекселл (Lars Leksell, Швеция).
- 1971 г. Первая компьютерная томография – Г.Н. Хаунсфилд (G.N. Hounsfield, Великобритания).
- 1973 г. Первый аппарат магнитно-резонансной томографии – Пол К. Лаутербур, Питер Мэнсфилд (Paul C. Lauterbur, Peter Mansfield, США, Великобритания).
- 1990 г. Первое использование компьютерной томографии в лучевой терапии (США).
- 1994 г. Первое лечение с использованием IMRT (США).
- 1996 г. Одобрение FDA первого программного обеспечения IMRT.
- 2001 г. Одобрение FDA роботизированной радиохирургии.

- 2002 г. Разрешение FDA на спиральную томотерапию.
- 2003 г. Первое применение технологии лучевой терапии с визуализацией (наведением) изображения (IGRT) [15].

2.1. Исторические аспекты фракционирования

Первыми практикующими лучевыми терапевтами были хирурги, и в 1920-е годы преобладающей стратегией было рассматривать ЛТ тождественной хирургическому вмешательству, с попытками уничтожения опухоли подведением единственной большой «тумороцидной» дозы. Соответственно, первое время в основном использовались однофракционные режимы облучения. К 1930-м годам было продемонстрировано, что мультифракционная ЛТ более эффективна, сопровождается меньшим числом осложнений и обеспечивает дифференцированные эффекты в опухолевых и нормальных клетках [62]. В 1934 году Henri Coutard et al. предложили схему фракционирования 200 рентген за фракцию, 5 раз в неделю, которая превратилась в стандартный современный режим 2 Гр за 25-35 фракций в течение 4-7 недель. Этот подход продемонстрировал высокие результаты для радиочувствительных опухолей (опухоль головы и шеи, плоскоклеточный и мелкоклеточный рак легкого, рак кожи и др.). Однако эффективность мультифракционного облучения оставалась низкой для лечения радиорезистентных опухолей, например, аденокарциномы легких, рака поджелудочной железы, печени, почек, меланом и сарком мягких тканей [87].

2.2. Эволюция технологии облучения, технологические этапы становления лучевой терапии

Основные понятия и постулаты радиационной биологии были разработаны до появления современных лучевых технологий, когда помимо мишени и нормальные ткани получали значительные дозы во время длительных курсов фракционированного облучения. К новым технологиям относятся IMRT (intensity-modulated radiation therapy – лучевая терапия, модулированная по интенсивности), IGRT (image-guided techniques radiation therapy – лучевая терапия, контролируемая по изображениям) и VMAT (volumetric modulated arc therapy – объемно модулированная дуговая терапия, или лучевая терапия, модулированная по объёму).

Обычная форма планирования лучевого лечения – виртуальное моделирование – может быть двух- (2D), трех- (3D) и четырехмерным (4D).

1. *Обычная (конвенциональная) фракционированная двухмерная ЛТ (conventional fractionation external beam radiotherapy), или внешняя ЛТ (external beam radiotherapy – EBRT) – 2DXRT* – двухмерное облучение с использованием киловольтных рентгеновских аппаратов, линейных ускорителей, генерирующих высокоэнергетическое рентгеновское излучение, или аппаратов гамма-терапии (например, кобальтовых пушек). При 2DXRT один пучок излучения подается с нескольких направлений. Лечение планируется или моделируется на специально откалиброванном диагностическом рентгеновском аппарате (симуляторе). Использование метода ограничено токсичностью для здоровых тканей, которые расположены близко к мишени.

2. *Трехмерная конформная лучевая терапия (3-dimensional conformal radiation therapy – 3DCRT)* позволяет формировать пучок излучения с переменным количеством лучей в соответствии с профилем цели (мишени) со стороны входящего луча (beam's eye view – BEV) с использованием многолепесткового коллиматора (a multileaf collimator – MLC). Многолепестковый коллиматор – ограничивающее устройство, состоящее из отдельных «лепестков» из материала с высоким атомным номером, обычно вольфрама, которые могут независимо перемещаться для формирования формы пучка (конформное облучение) и изменения его интенсивности. В действительности MLC обеспечивают модуляцию плотности потока, а не интенсивности, хотя прижился именно первый термин. Когда объем лечения соответствует форме опухоли, относительная токсичность излучения для окружающих нормальных тканей снижается, что позволяет доставить к опухоли более высокую дозу излучения, чем позволяют обычные методы.

3. *Лучевая терапия с модулированной интенсивностью (intensity-modulated radiation therapy) – IMRT* – это усовершенствованный тип высокоточного излучения, представляющий собой следующее поколение концепции 3DCRT. Методика позволяет приспособить объем лечения к сложной форме опухоли, что особенно важно при ее расположении вблизи критических структур. Исполь-

зование IMRT сопряжено с определенными сложностями при планировании и требует достаточного опыта от медицинского персонала.

4. *Лучевая терапия, модулированная по объёму* (или дуговая терапия с объемной модуляцией – volumetric modulated arc therapy – VMAT) – технология, которая позволяет достичь высококонформного распределения дозы при охвате целевого объема и сохранении нормальных тканей. Специфика этой методики заключается в изменении трех параметров во время лечения. VMAT обеспечивает доставку дозы с помощью вращающегося гантри-поля с вращением на 360° с одной или несколькими дугами – изменения скорости и формы пучка с помощью MLC и смены скорости потока энергии (мощности дозы). Преимущество VMAT перед использованием статического поля (IMRT) заключается в сокращении времени доставки излучения. Влияние этих технологий на дозу, получаемую органами риска (organ at risk – OAR) неоднозначно, индивидуально и зависит от конкретного плана.

5. *Стереотаксическая лучевая терапия и радиохирургия* – виды дистанционной лучевой терапии, позволяющие в короткие сроки производить высокоточную доставку к опухоли высокой дозы излучения с минимальным повреждением окружающих здоровых тканей. Методы были внедрены в практику в 1967 г. и долгое время применялся только при лечении интракраниальных опухолевых поражениях. В 90-е гг. XX века начато использование SBRT для лечения экстракраниальных новообразований. В 2001 г. SBRT для лечения экстракраниальной патологии одобрена FDA (Food and Drug Administration) в США, а в настоящее время включена в мировые стандарты лечения.

Глава 3.

Стереотаксическая радиотерапия и радиохирургия

Термин «радиохирургия» был впервые введен нейрохирургом Ларсом Лескелем (Lars Leskel) в 1951 году [71]. Под стереотаксической радиохирургией (stereotactic radiosurgery – SRS) обычно понимают подведение к мишени однократной большой дозы (20 Гр и более). Стереотаксическая лучевая терапия тела (Stereotactic body radiation therapy – SBRT), иногда называемая стереотаксическая абляционная лучевая терапия (stereotactic ablative radiotherapy – SABR), используется для экстракраниальных опухолей и обычно проводится в 1-5 фракциях по 7-20 Гр каждая. Обозначение «body-тело» в этом термине акцентирует экстракраниальный характер облучения, поскольку изначально метод был создан для лечения опухолевых поражений головного мозга. Оба этих подхода предполагают «экстремальное» гипофракционирование. Существуют и более мягкие формы гипофракционирования с использованием доз за фракцию в диапазоне 2,5-4 Гр [62]. Нередко SBRT может обозначаться по названию производителя, или конкретной модели используемой аппаратуры (Axesse, Cyberknife, Gamma Knife, Novalis, Primatom, Synergy, X-Knife, TomoTherapy, Trilogy, Truebeam и пр.), что может сбивать с толку специалистов нерадиотерапевтического профиля.

3.1. Классификация стереотаксического высокодозного облучения

В. Qiu et al. (2020) на технологической основе предлагают следующую классификацию стереотаксического высокодозного облучения [87]:

- 1) гамма-нож-SABR (Gamma-knife-SABR – G-SABR);
- 2) SABR линейного ускорителя (Liner-accelerator-SABR – L-SABR);
- 3) кибер-нож-SABR (CyberKnife-SABR – C-SABR);
- 4) Tomo-SABR (T-SABR); 6) Proton-SABR (P-SABR);
- 5) стереотаксическая абляционная брахитерапия (Stereotactic ablative brachytherapy – SABT).

Последняя, основанная на тонкой визуализации и детальном планировании, используя закон обратных квадратов, предлагает высокоточное внутреннее конформное распределение дозы и может

быть с высокой мощностью дозы (high-dose rate – H-SABT) и низкой мощностью дозы (low-dose rate – L-SABT).

3.2. Эффективность СТЛТ

Многочисленные клинические исследования и мета-анализы продемонстрировали высокий локальный контроль (local control – LC) при проведении SRS/SBRT/SABR. Так, SBRT при функционально неоперабельном раке легких показала 3-летнюю частоту LC первичной опухоли 91-98,7% при 3-летней общей выживаемости 55-73%. Локальный контроль при SBRT метастатических поражений позвоночника достигает 80-100, в то время как при обычном облучении (EBRT) – 80-86%.

Классический принцип конвенциональной фракционированной радиотерапии определяет истощение и гибель тканевых стволовых клеток предшественников, как обязательное условие успешного лечения опухоли. Микроокружение опухоли обеспечивает сигналы к стимуляции пролиферативной активности клеток. Репродуктивная (клоногенная или постмитотическая) гибель клеток возникает в результате индукции радиацией двухцепочечных разрывов ДНК. Клоногенспецифическая чувствительность при этом зависит от способности клеток к репарации повреждений.

Остаточные, не устранённые или неправильно восстановленные двухцепочечные разрывы ДНК приводят к генетической нестабильности, прогрессивно накапливаются мутации и хромосомные aberrации, повреждающие клетки. Количество подобных нарушений нарастает с каждым циклом митоза и в конечном итоге приводит к гибели клетки из-за генной дисфункции. Эффект лучевой терапии основан на том, что большинство типов опухолевых клеток имеют меньшую способность к репарации лучевых повреждений по сравнению с клоногенными клетками нормальных тканей. Фракционированное облучение низкими дозами позволяет во время межфракционного интервала более эффективно восстанавливаться от лучевых повреждений клоногенным клеткам нормальной ткани относительно клеток опухоли, тем самым обеспечивая защиту здоровых тканей и увеличивая терапевтическое соотношение. Чтобы подвести достаточную дозу для максимального контроля опухоли требуются длительные курсы лечения.

В отличие от традиционной ЛТ проведение SBRT предполагает мощный радиобиологический эффект от больших доз радиации за фракцию. Механизм ответной реакции опухоли после однократно подведенной высокой дозы радиации отличается от реакции опухоли на стандартное фракционирование. Высокие дозы облучения, подведенные за одну крупную фракцию, приводят к полной ликвидации опухолевых клеток посредством сосудисто-эндотелиального апоптоза, независимо от гистологической структуры поражения и реализации иммунных механизмов.

В частности, излучение приводит к ускоренной активации фермента клеточной мембраны сфингомиелиназы (ASMase), который в свою очередь приводит к гидролизу сфингомиелина, способного генерировать проапоптотический предшественник церамида и таким образом индуцирует трансмембранный сигнал апоптоза. Чтобы активировать подобный механизм апоптоза, размер фракции должен превышать 10 Гр. Линейно-квадратичная модель не может точно предсказать реакцию опухолевых клеток на высокие дозы за фракцию.

Гипофракционированная SBRT занимает промежуточное положение между фракционированной лучевой терапией и радиохирургией. До настоящего времени не совсем ясно, в какой степени гипофракционные схемы лечения (от двух до пяти фракций), отличаются от схем лечения с подведением одной аблативной дозы за фракцию, в отношении ответа опухоли и реакции нормальной ткани. Есть данные, что по сравнению с режимами подведения высокой дозы радиации за одну фракцию гипофракционные схемы облучения имеют худший локальный контроль опухоли. Преимуществом использования гипофракционного режима является более низкая токсичность.

Имеется большое разнообразие в дозах и схемах фракционирования при проведении высокодозного облучения, часто это связано с традициями, предпочтениями и технологическими особенностями оснащения в различных центрах. Некоторые клиники придерживаются стратегии «одной большой дозы за фракцию» для всех случаев, другие же предпочитают дифференцированное использование гипофракционных схем радиотерапии. Большинство современных схем проведения SBRT при различных локализациях опухоли получены эмпирическим путем, что часто является результатом осторожной эскалации дозы [124].

3.3. Терапевтический индекс (терапевтическое отношение)

Практически с первых шагов использования радиации в медицине был признан фундаментальный принцип ЛТ – концепция терапевтического соотношения, подхода «риск против пользы».

Терапевтическое отношение подразумевает взаимосвязь благоприятных и неблагоприятных эффектов лучевой терапии, соотношение между вероятностями контроля опухоли и повреждения нормальной ткани.

Диапазон между эффективной и токсической дозами называют терапевтическим окном, или окном безопасности.

То есть – терапевтический индекс в радиобиологии определяет, как вероятность контроля опухоли (tumor control probability – TCP) соотносится с вероятностью осложнений в нормальных тканях (normal tissue complication probability – NTCP) для различных доз. Достижение оптимального баланса между TCP и NTCP является основной целью лучевой терапии. TCP и NTCP вычисляются механистическими моделями, а их кривые имеют сигмовидную форму, расстояние между которыми представляют *терапевтический индекс (терапевтическое окно)*, увеличивающийся, если область между двумя кривыми становится больше (рис. 1).

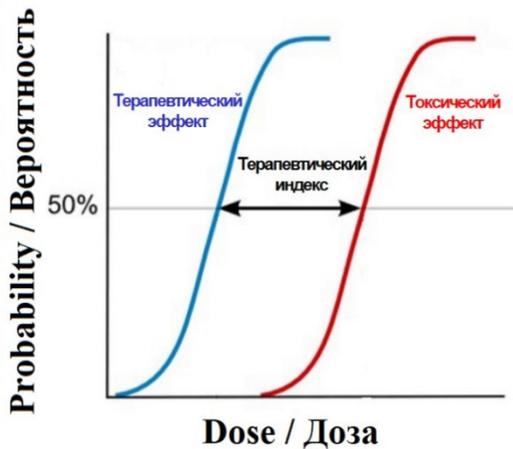


Рис. 1. Терапевтический индекс.

А. Niemierko в 1997 году была разработана модель критического объема, используемая эмпирически для 3D планов лечения, которые включают расчет эквивалентной равномерной дозы (equivalent uniform dose – EUD) [79]. Эта модель основана на гипотезе о том, что клоногенные клетки, имеющие одинаковые кривые выживаемости, могут быть облучены одинаковой равномерной дозой. В модели учитываются соотношения α/β , количество клоногенных клеток, доза, количество фракций, тип ткани, тип опухоли, а также фракция выживших клеток при облучении 2 Гр (surviving fraction after 2 Gy irradiation – SF2). По мере увеличения SF2 TCP уменьшается. Дополнительно, при сравнении различных схем фракционирования используется EQD2 (эквивалентная доза при 2 Гр). TCP и NTCP имеют важное клиническое значение: они могут быть использованы для оценки эффективности лечения и осложнений. Гистограммы объема дозы, созданные системами планирования лечения (в частности, 3D-конформной лучевой терапией и IMRT) при математическом моделировании TCP и NTCP полезны для графической демонстрации нормальных соотношений повреждений тканей в пределах объема облученной опухоли и могут использоваться для руководства врачами во время планирования лечения [15].

Стандартная (конвенциональная) ЛТ обеспечивает наибольшее терапевтическое соотношение, когда высокую суммарную дозу получают большие области, часто охватывающие значительные объемы нормальной ткани. Радиобиологической основой стандартного размера фракции является дифференцированная способность нормальных здоровых клеток восстанавливаться интрафракционно от молекулярных и метаболических повреждений, вызванных ионизирующим излучением, в сравнении с опухолевыми клетками. Эта способность является следствием взаимодействия факторов как специфичных для клеток (механизмы репарации ДНК), так и специфичных для окружающей среды (оксигенация и состояние сосудов). Терапевтическое окно сужается по мере увеличения размера поля [107, 108, 109, 110].

При больших дозах за фракцию результирующее повреждение отдельных клеток и микроокружения существенно больше, и критично как для нормальных, так и для опухолевых клеток. Точность подведения дозы при SRS/SBRT/SABR изначально обеспечивали жесткие системы иммобилизации. Благодаря внедрению более мобильных устройств иммобилизации и высокоточных систем наведе-

ния на машинном изображении стало возможным добиваться ежедневного изменения настроек менее чем на 1 мм. Кроме того, благодаря достижениям в алгоритмах планирования лечения и возможностям формирования пучка достигается высокая конформность и быстрое снижение дозы на границах целей, даже с мишенями неправильной формы. Это, в свою очередь, увеличивает терапевтическое соотношение. Однако некоторый объем нормальной ткани все же получает абляционную дозу, которая пропорциональна PTV. Поэтому при крупных размерах мишеней и близости критических структур иногда целесообразно предпочесть однофракционному облучению фракционированное, с подведением нескольких крупных доз.

J.D. Zindler et al. (2015) предложили новый подход к определению дозы опухоли при стереотаксической лучевой терапии (SRS/SBRT/SABR), учитывающий толерантность органов риска (organ-at-risk – OAR) и предписанную изотоксическую дозу (IDP), которая установлена опытным путем и основана на ограничениях конвенциональной фракционированной лучевой терапии [128]. Доза облучения, при использовании IDP, назначается на основе заранее определенного уровня вероятности осложнений в нормальных тканях и OAR при заданном ограничении объема дозы. Одновременно, предписанная общая доза на опухоль (total tumor dose – TTD) подводится максимально до технически достижимого уровня для увеличения вероятности местного контроля опухоли (tumor control probability – TCP).

Использование IDP предполагает снижение дозы облучения, или увеличение числа фракций при превышении толерантности OAR (сдвиг парадигмы назначения доз от целевых уровней толерантности к OAR-зависимым уровням IDP). Соответственно, доза увеличивается, если позволяет толерантность OAR и ожидается хороший эффект (TCP более 90%). Если вероятность контроля опухоли высока и терапевтическое соотношение приемлемы, то предпочтение может отдаваться однократному облучению, в противном случае возникает вопрос о балансе эффективности и токсичности [107, 108, 109, 110].

3.4. Параллельные и последовательные органы

Эффективность SRS и SBRT непосредственно зависят от структурной и функциональной организация ткани, упрощенную модель которой предложили H.R. Withers et al. (1988) [118, 119, 120, 121].

Они рассматривали ткани как состоящие из функциональных субъединиц (functional subunits – FSU), минимальных анатомических образований, способных выполнять функцию ткани или поддерживать ее структурную целостность.

По аналогии с электрическими цепями, расположение FSU в разных тканях может быть либо «параллельным», либо «последовательным» (или некоторой комбинацией), и это расположение в первом приближении будет определять радиационную устойчивость ткани в зависимости от объема лечения.

Спинальный мозг, кожа и многие трубчатые или мешковидные органы ведут себя так, как если бы их FSU были расположены последовательно, то есть повреждение даже небольшого объема ткани потенциально может привести к серьезным функциональным потерям. И наоборот, для таких тканей, как легкие, печень и почки, FSU расположены параллельно, что означает, что функциональные потери будут незначительными или вообще не возникнут даже при высоких дозах.

Таким образом, проведение SRS и SBRT закономерно более эффективно и безопасно в *параллельных* органах, таких как легкие, печень, поджелудочная железа, почки и простата, поскольку это позволяет их отношению доза/объем.

Последовательные органы (пищевод, желудок, кишечник), как правило, не подходят для этих режимов [87].

3.5. Факторы, определяющие токсичность SRS/SBRT/SABR

Абляционные дозы, используемые при SRS/SBRT/SABR, могут вызывать различные типы токсичности. Одним из наиболее тяжелых и распространенных осложнений является радионекроз (radionecrosis – RN), риск развития которого обычно достигает пика примерно через 6-12 месяцев после лечения. RN может как сопровождаться тяжелыми клиническими проявлениями, так и быть бессимптомным. Лучевые методы диагностики могут демонстрировать полиморфную картину.

Например, перифокальный отек и масс-эффект при облучении головного мозга. Причем современные методы диагностики при визуализации не всегда убедительно могут дифференцировать постлучевые изменения с прогрессированием процесса [109].

Оценка данных лучевой диагностики и изменений после SBRT и определение объективных критериев ответа, связи различных рентгенологических признаков с опухолевым ответом и токсичностью являются предметом продолжающихся активных исследований.

Признано, что после SBRT опухолевых очагов в легких использование для оценки эффекта стандартных критериев RECIST недостаточно эффективно в связи с полиморфизмом развивающихся рентгенографических признаков после лечения – картина «матового стекла» (GGO – Ground-glass opacification/opacity), уплотнение, рубцевание и/или фиброз.

Как правило, рентгенологические изменения включают ранний воспалительный ответ (≤ 3 месяцев), снижение активности накопления (SUV) 18-FDG при ПЭТ-КТ и в заключении – фиброз (от 6 месяцев – до нескольких лет) в зоне проведения SBRT. Увеличение в динамике при КТ размеров и плотности облученного опухолевого очага в раннем периоде после лечения (< 12 месяцев), или появление новых очагов в более поздние сроки (> 12 месяцев) следует рассматривать как подозрение на рецидив, что требует уменьшения интервалов между КТ, применения ПЭТ-КТ, решения вопроса о целесообразности выполнения биопсии и хирургического или повторного радиотерапевтического лечения [109].

В исследовании M.I. Ronden et al. (2018) острые изменения наблюдаются в течение первых 6 месяцев после облучения легких и манифестируют на КТ изображениях следующим образом: у 24% больных – в виде диффузной консолидации; у 21% – в виде пятнистой консолидации; в 8% – как диффузное затемнение типа матового стекла; в 8% – как пятнистое затемнение типа матового стекла.

В свою очередь, поздние рентгенологические изменения проявляются через 6 месяцев или позже и подразделяются на: обычную картину фиброза (62%); рубцовый фиброз (15%); фиброз с масс-эффектом (14%), причем последний бывает трудно отличить от местного рецидива.

Существует ряд рентгенологических признаков высокого риска рецидива, позволяющих дифференцировать рецидив от фиброзных изменений – нарастающее и последовательное снижение прозрачности, кранио-каудальный рост, выпуклые края, исчезновение линейных границ и потеря воздуха на бронхограммах [91].

3.6. Лавинный феномен

Лавинный феномен (avalanche phenomenon) – явление, свойственное облучению вообще, когда количество клеток радиочувствительной ткани падает до определенного уровня после того, как клетки подверглись воздействию радиации, оставшиеся клетки умирают быстрее (лавинообразно, каскадно). Однако этот эффект наиболее заметен при высоких дозах облучения и при использовании дополнительных методов лечения (химиотерапия, хирургическое вмешательство).

3.7. Феномен радиационного отзыва

Феномен радиационного отзыва (Radiation Recall Phenomenon) – тяжелая реакция, которая наблюдается, в частности, в коже облученной области во время химиотерапии после окончания ЛТ (отек, эритема, сыпь и изменение цвета). Механизм – взаимодействие базальных слоев облученной кожи с цитотоксическими агентами, выделяемыми из погибших в результате химиотерапии клеток. Чаще этот эффект наблюдается у пациентов, получающих химиотерапию после длительного периода облучения (недели, месяцы). Основными, связанными с феноменом химиотерапевтическими агентами являются актиномицин, доксорубицин, метотрексат, фторурацил, гидроксимочевина и паклитаксел [15].

Глава 4.

Радиочувствительность, принципы 4R/5R, основные эффекты облучения и влияние на них фракционирования

Рассмотрим радиочувствительность, принципы 4R/5R, основные эффекты облучения и влияние на них фракционирования.

4.1. Типы клеточных повреждений, вызванных радиацией

Рассмотрим типы клеточных повреждений, вызванных радиацией.

1. Летальные повреждения (LD – lethal damage) – необратимые, непоправимые, приводящие к гибели клеток.

- ✓ Обычно в результате прямого воздействия радиации.
- ✓ Двойной разрыв ДНК.
- ✓ Чаще при сильном излучении.

2. Сублетальные повреждения – (SLD – sublethal damage) – могут быть восстановлены в течение нескольких часов при нормальных условиях, при отсутствии дополнительного облучения, вызывающего дальнейшие нарушения.

- ✓ Обычно при косвенном воздействии радиации.
- ✓ Разрыв одной нити ДНК.
- ✓ Чаще при слабом излучении.

3. Потенциально смертельные повреждения (PLD – potentially lethal damage). Исправляются в зависимости от изменений в окружающей среде клетки после воздействия радиации. В нормальных условиях этот тип повреждения является смертельным для облучаемых клеток, находящихся в митозе. Однако такое повреждение может быть устранено после прекращения действия радиации, поскольку клетка получает сигнал о наличии условий, которые не подходят для митоза, и запускается путь восстановления повреждения, блокируя митоз [15].

4.2. Реакция различных органов и тканей на облучение

Ткань определяется как совокупность аналогично функционирующих клеток, которые имеют одинаковое происхождение и схожи по форме и структуре. Ткани образуют органы.

В 1906 году французские радиационные биологи J. Bergonie и L. Tribondeau, а затем Claude Regaud, на основании данных гистологических исследований выдвинули предположения, что ЛТ более эффективна в отношении клеток, которые были:

- 1) активно делящимися;
- 2) способными к делению в течение длительного времени;
- 3) низко/недифференцированными.

Они предположили, что многократное облучение способно уничтожать опухолевые клетки, сохраняя нормальные ткани, попадающие в поле облучения [16]. Концепция радиочувствительности клеток в целом осталась неизменной до наших дней (закон Бергони и Трибондо): «чувствительность клеток к радиации прямо пропорциональна их репродуктивной активности и обратно пропорциональна степени их дифференциации».

Согласно этому закону радиочувствительность ткани зависит от:

- 1) количества малодифференцированных клеток в ткани;
- 2) количества активных митотических клеток;
- 3) продолжительности активной пролиферации клеток.

Классификация на основании кинетических и репродуктивных характеристик тканевых клеточных систем:

1. *Клеточные популяции стволового типа.* Это самообновляющиеся системы, основная функция которых заключается в продуцировании клеток для других клеточных систем организма. Примером такого типа систем могут служить, например, стволовые клетки костного мозга или эпителия. Основываясь на данных радиационной патологии эту группу можно рассматривать как чрезвычайно чувствительную к радиационным воздействиям.

2. *Делящиеся переходные клеточные популяции.* Как правило, они представлены клетками, поступающими из стволового пула. Эти клетки уже начинают дифференцироваться, однако еще не утратили полностью своего митотического потенциала. Примером такого типа

популяций может служить пул ретикулоцитов костного мозга или клетки базального слоя кожи. В некоторых случаях радиочувствительность этих клеток может быть даже несколько выше, чем клеток стволового пула.

3. *Простые переходные популяции.* Они репопулируются за счет клеток делящихся переходных популяций и в дальнейшем передают их в статически закрытый зрелый пул функционально дифференцированных клеток. В этом пуле продолжается дифференцировка клеток. Примером такого типа клеточных популяций могут служить ранние эритроидные и лимфоидные клетки. Этот клеточный пул иногда также обозначают как постмитотический. С точки зрения радиобиологии он представлен стабильными и относительно радиорезистентными клетками.

4. *Закрытые статические популяции.* Эти клеточные популяции представлены зрелыми высокодифференцированными клетками, полностью лишенными митотического потенциала. Как правило, эти клетки предназначены для выполнения высокоспециализированных ограниченных функций, имеют определенный период жизни и погибают за счет апоптоза. Примером клеточных популяций такого типа являются клетки нервной системы человека, жестко фиксированные в пост-митотическом состоянии и высоко резистентные в отношении радиационных воздействий.

В 1992 г. Michalowski A.S. предложил свою классификацию радиочувствительности тканей.

1. *Иерархические ткани (Hierarchical tissues)* – разделены на 2 вида – дифференцированных и недифференцированных групп клеток Н-типа, которые могут непрерывно делиться (например, стволовые клетки и эпителиальные клетки кишечника). Остро реагируют на радиацию.

2. *Гибкие ткани (flexible tissues)* – все клетки F-типа, делятся при необходимости (например, клетки печени и щитовидной железы) и погибают при повреждении тканей. Являются поздно реагирующими тканями.

Многие ткани реагируют на облучение таким образом, что их можно считать гибридом этих двух типов тканей. Реакция ткани на

излучение исходит как от паренхиматозных клеток, так и от стромальных клеток сосудов.

Клетки, которые не могут обновляться (такие как клетки центральной нервной системы и поперечнополосатых мышц), менее чувствительны к радиации, и их радиационное повреждение обычно связано с воздействием на строму сосудов. Доза излучения, уничтожающая большинство стволовых клеток в паренхиматозной ткани, реактивирует популяцию функциональных зрелых клеток, а зрелые клетки, происходящие из стволовых, играют важную роль в восстановлении функции ткани после облучения [73].

Классификация радиочувствительности тканей P. Rubin, G.W. Casarett. в соответствии с кинетикой пролиферации:

1. Ткани, состоящие из вегетативных интермитотических клеток (vegetative intermitotic cells – VIM). Это недифференцированные клетки с очень коротким клеточным циклом, самые радиочувствительные, недолго живущие, с быстрой репопуляцией.

2. Ткани, состоящие из дифференцированных интермитотических клеток (differentiated intermitotic cells – DIM). Клетки с ограниченной способностью к пролиферации, их митотическая активность прекращается при достижении зрелости, например, сперматогонии.

3. Мультипотентные соединительные ткани (multipotential connective tissues – MPC). Состоят из клеток с относительно длительной жизнью, делящихся с неравномерными интервалами, например, фибробластов.

4. Ткани, состоящие из возвращающихся постмитотических клеток (reverting postmitotic cells – RPM). Это длительно живущие клетки, не делящиеся в нормальных условиях, только при необходимости, например, паренхиматозные клетки печени, легких и почек.

5. Ткани, состоящие из фиксированных постмитотических клеток (fixed postmitotic cells – FPM). Это очень долго живущие, наиболее радиорезистентные клетки, которые никогда не делятся, например, клетки ЦНС, мышечные клетки и эритроциты [15, 92].

6. Реакция ткани на излучение определяется ее клетками-предшественниками и сведена в таблице 1 [15].

Таблица 1

Радиочувствительность тканей
(адаптировано из М. Beuzadeoglu, 2020) [15]

Чувствительность	Ткань
Наиболее чувствительные	Лимфоциты Незрелые кроветворные клетки Кишечный эпителий Сперматогония Клетки фолликулов яичника
Чувствительные	Эпителий мочевого пузыря Эпителий пищевода Слизистая оболочка желудка Эпидермальный эпителий Эпителий хрусталика зрительного нерва
Умеренно чувствительные	Эндотелий Растущие кости и хрящи Фибробласты Глиальные клетки Эпителий молочной железы Эпителий легких Почечный эпителий Печеночный эпителий Эпителий поджелудочной железы Эпителий щитовидной железы Эпителий надпочечников
Малочувствительные	Зрелые эритроциты Мышечные клетки Зрелая соединительная ткань Зрелые кости и хрящи Ганглиозные клетки

Эффекты облучения могут быть стохастическими (случайными) и детерминированными (предопределенными), соматическими и генетическими.

Детерминированные (нестохастические, определенные) эффекты облучения (от лат. *determino* – определяю – причинно-обусловленные предшествующими событиями) – биологические эффекты, вызванные ионизирующим излучением в облученном орга-

низме, которые возникают при достижении определенного дозового порога, вероятность их появления и степень проявления увеличиваются с дальнейшим повышением дозы.

Стохастические эффекты облучения (от греч. *stochastikós* – умеющий угадывать; случайные, вероятностные) – биологические эффекты, вызванные ионизирующим излучением в облученном организме или его потомстве, не имеющие дозового порога возникновения, вероятность появления которых увеличивается при повышении доз, а тяжесть проявления не зависит от дозы.

Все эффекты облучения делятся на три группы: острые, подострые и хронические.

Острые эффекты облучения, происходящие в первые 6 месяцев. Если доза облучения достаточно высока и толерантность паренхимы органа превышена, то происходит гибель органа. Если толерантная доза не превышена – орган продолжает функционировать полностью или частично, даже при наличии повреждения паренхимы.

Подострые эффекты – проявляются между 6 и 12 месяцами. Наблюдается вторичная дегенерация паренхимы, приводящая к снижению устойчивости к радиации.

Хронические эффекты – возникают после 12 месяцев.

Острые и подострые эффекты излучения являются детерминированными (нестохастическими эффектами), а их интенсивность прямо пропорциональна дозе, выше пороговой. Катаракта, эритема кожи, бесплодие, лучевой миелит и фиброз – примеры детерминированных эффектов. Хронические эффекты радиации являются стохастическими (случайными). Пороговой дозы для них не существует, как и связи между дозой и индивидуальными проявлениями. Происходит канцерогенез, генетические мутации и хромосомные aberrации [15].

Кривые выживаемости

Форма кривых выживаемости клеток при действии излучения не может быть объяснена индивидуальными их различиями. На них отсутствует четкий порог: гибель одной части клеток наблюдается даже при низких дозах облучения, а другой, в той же популяции – при значительно более высоких дозах. Объяснить этот феномен с «биологических» позиций (т.е. исходя из индивидуальных характеристик)

невозможно, т.к. внутри генетически однородной популяции не могут находиться клетки, различающиеся по устойчивости к облучению в сотни и тысячи раз.

В 20-е годы прошлого века в противовес «биологическому» сформировался «физический» (или «биофизический») подход к объяснению и интерпретации кривых выживаемости клеток, подвергнутых действию ионизирующего излучения. В основе «биофизического» направления лежала «теория точечного тепла», разработанная Ф. Дессауэром (Friedrich Dessauer) в 1922 г. Эта теория опиралась на следующие основные идеи:

➤ Несмотря на то, что плотность поглощенной энергии в облучаемом объекте в среднем очень низкая, энергия самих актов поглощения весьма велика и поэтому в микрообъемах вещества, в которых произошли акты поглощения энергии, происходит его локальное нагревание (т.е. появление т.н. «точечного тепла»), в результате чего вещество претерпевает значительные точечные изменения, обусловленные разрывом химических связей или активацией химических реакций.

➤ Пространственное распределение мест локализации «точечного тепла» внутри облученной клетки имеет случайный характер, то есть является чисто статистической, вероятностной функцией.

➤ Клетка гетерогенна (неоднородна) по своему объему в отношении чувствительности к облучению и имеет как исключительно важные для жизни области, повреждение которых приводит клетку к гибели, так и области, относительно несущественные для выживания клетки.

В итоге, конечный эффект в клетке (например, гибель) определяется вероятностью осуществления акта поглощения энергии (т.е. появления «точечного тепла») в жизненно важных областях (микрообъемах) клетки. При увеличении дозы облучения вероятность осуществления акта поглощения энергии в этих клеточных областях возрастает, при снижении дозы – уменьшается. Однако даже при очень высокой дозе облучения существует определенная вероятность того, что в каком-то количестве клеток не произошло актов поглощения энергии в жизненно важных клеточных областях и поэтому эти клетки останутся неповрежденными облучением. И наоборот – даже при очень низкой дозе существует вероятность того, что в каком-то количестве клеток произойдут они произойдут, что вызовет гибель этих клеток [15].

Теория мишени – фактически является современным развитием теории Ф. Дессауэра. В основе лежат принцип попадания и принцип мишени.

Принцип попадания может быть сформулирован следующим образом: поглощение энергии в облучаемом объеме происходит в результате дискретных актов взаимодействия квантов излучения с веществом – т.н. «попаданий», пространственное распределение которых в облучаемом объеме имеет случайный характер. Фактически попаданием считается возникновение акта ионизации каких-либо молекул в облучаемом объеме.

Принцип мишени – клетка имеет в своем составе как исключительно важные для выживания области – т.н. «мишени», радиационное повреждение которых приводит клетку к гибели, так и области, относительно несущественные для выживания клетки. Таким образом, «принцип мишени» отмечает биологическую гетерогенность различных областей (микрообъемов) внутри клетки в отношении чувствительности к облучению, а именно, наличие внутри клетки «мишеней» – чувствительных областей, радиационное повреждение которых приводит клетку к гибели.

Можно предположить, что существуют одноударные мишени (когда мишень считается пораженной при одном попадании) и многоударные мишени (когда мишень считается пораженной при 2, 3, 4, ..., n попаданиях). Также вероятно существование в клетке только одной мишени (одномишенная клетка), или нескольких мишеней (многомишенная клетка). Причем гибель многомишенной клетки может наступить лишь после того, как все мишени получат определенное число попаданий (при этом каждая из этих мишеней может отличаться по ударности).

Для описания кривых пострадиационной выживаемости клеток используют различные математические модели. Двумя простейшими моделями являются: 1) многоударная-одномишенная модель и 2) одноударная-многомишенная модель.

Использовать более сложные многоударные-многомишенные модели (основанные на теории мишени) весьма ненадежно, т.к. по форме кривых выживаемости невозможно сделать однозначный вывод об ударности и мишенности объекта. Практически одинаковые по форме кривые выживаемости можно получить, варьируя число мишеней и их ударность. Так, например, кривая выживаемости для

10-ударных-16-мишенных объектов очень хорошо совпадает с кривой выживаемости для 48-ударных-1-мишенных объектов.

Кроме того, теория мишени не учитывает наличия в клетке репарационных процессов, которые существенно затрудняют интерпретацию кривых выживаемости только с позиций мишенности и ударности объекта [15].

4.3. Принцип 4R/5R

**(repair + reoxygenation + redistribution + repopulation/
± radiosensitivity) и влияние на них фракционирования**

Принципы «четырёх R» (4R) в радиобиологии были описаны H.R. Withers (1975) для обычной дистанционной ЛТ (конвенциональной фракционированной ЛТ – conventional fractionation external beam radiotherapy, внешней, наружной – external beam radiotherapy – EBRT), став краеугольным камнем радиобиологической теории.

Основными постулатами принципа 4R были:

- 1) репарация (repair),
- 2) реоксигенация (reoxygenation),
- 3) перераспределение (redistribution),
- 4) репопуляция (repopulation).

5) позже был предложен пятый важный аспект (5R) – радиочувствительность (radiosensitivity), сформулированный G.G. Steel et al. (1989) и во многих отношениях неразрывно связанный с репарацией [101].

В условиях обычной ЛТ «реоксигенация» и «перераспределение» увеличивают радиочувствительность опухолевых клеток и способствуют их уничтожению, а «репарация» и «репопуляция», наоборот, связаны с возникновением радиационной устойчивости и снижением радиочувствительности [87].

Внедрение различных вариантов гипофракционирования, в том числе стереотаксической радиохирургии (SRS) и стереотаксической лучевой терапии (SBRT/SABR) показало, что радиобиология опухоли и нормальных тканей при использовании этих методов не соответствует многим традиционным представлениям, характерным для классического фракционирования. Достаточно быстро пришло понимание, что 4R/5R концепции радиобиологии не могут адекватно объяснить эффекты стереотаксического высокодозного облучения.

Для понимания концепции 4R/5R важно описать особенности некоторых механизмов, ответственные за ее реализацию: *разрывы ДНК, смерть клетки, апоптоз и некроптоз*.

✓ *Разрывы ДНК.* Достаточно давно было показано, что за гибель клеток от ионизирующего излучения ответственны двухцепочечные разрывы ДНК – (double strand breaks – DSB), особенно остаточные. R.A. El-Awady et al. в своем исследовании (2003) на 9 линиях опухолевых клеток человека выделили 3 основных функциональных их нарушения: 1) ограничения пролиферации; 2) нарушения дифференцировки; 3) хромосомная и генетическая дестабилизация [38, 87]. За обеспечение восстановления отдельных разрывов отвечают три системы: гомологичной рекомбинации (HR), негомологичного соединения концов (NHEJ) и микрогомологически опосредованного соединения концов (MMEJ), также называемого резервным NHEJ.

Именно в указанном порядке эти пути репарации увеличивают вероятность ошибок при восстановлении, вызывая летальные аберрации, такие как двухцентровая перестройка (dicentric rearrangement) [93]. Отдельные участки (сайты) разрыва ДНК, отмеченные модифицированным гистоном γ H2AX на больших участках ДНК, окружающих разрыв, можно визуализировать с помощью меченых антител [114]. Сам разрыв отмечается MRN из комплекса MRE11, Rad50 и нибрина (Nibrin), удерживающих вместе поврежденные концы.

✓ *Смерть клетки.* Оценка радиационной клеточной летальности лучше всего демонстрируется с помощью клоногенного анализа: отдельные жизнеспособные клетки делятся пять или шесть раз в культуре, образуя счетную колонию. Используя этот инструмент, форма кривой выживаемости доза-ответ для большинства опухолевых клеток показывает начальную плечевую область, за которой следует простая экспонента, когда она отображается как логарифм выживаемости в зависимости от дозы. Это ключевая особенность с точки зрения оценки различий в летальности между обычным лечением и лечением SRS/SBRT.

Митотическая катастрофа является наиболее частым механизмом смерти клеток – две хромосомы фрагментируются под воздействием радиации и впоследствии сливаются. Если производная структура содержит две центромеры (дидентрик является одним из

примеров), она может прикрепляться к обоим полюсам митотического веретена и физически ограничивать деление клетки. Аутофагия, некроз или старение являются второстепенными компонентами радиационной летальности.

Аутофагия наблюдается как изоляция органелл, мембраны и цитоплазмы в аутофагосомы. Некроз высвобождает клеточное содержимое, вызывая воспаление. При старении клетки перестают делиться, что связано с повышением уровня β -галактозидазы (β -galactosidase), связанным со старением очагов гетерохроматина (senescence-associated heterochromatin foci – SAHF) и фрагментацией ДНК при окрашивании. Однако митотическая катастрофа может запускать апоптотический фенотип, вторичный по отношению к остановке митоза (ядерная фрагментация, активация каспаз – caspase - 3 и 9, повышение уровня bax, подавление bcl2). Высокие дозы SRS/SBRT могут избирательно запускать апоптоз в эндотелиальных клетках, что может влиять на контроль опухоли [93].

Апоптоз и некроптоз – два основных пути гибели клеток. После высокодозного облучения (SRS/ SBRT/ SABR) в отличие от обычного (EBRT) клетки погибают чаще по пути некроптоза, а не апоптоза.

✓ **Аноптоз** (др.-греч. ἀλόπτωσις «падение») – регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Возникшие фрагменты быстро (в среднем за 90 минут) фагоцитируются макрофагами либо соседними клетками, минуя развитие воспалительной реакции. Морфологически регистрируемый процесс апоптоза продолжается 1-3 часа. Одной из основных функций апоптоза является уничтожение дефектных (повреждённых, мутантных, инфицированных) клеток.

В многоклеточных организмах апоптоз задействован в процессах дифференциации и морфогенеза, в поддержании клеточного гомеостаза, в обеспечении важных аспектов развития и функционирования иммунной системы. Апоптоз наблюдается у всех эукариотов, начиная от одноклеточных простейших и вплоть до высших организмов. В программируемой смерти прокариотов участвуют функциональные аналоги эукариотических белков апоптоза. В организме взрослого человека в результате апоптоза погибает ежедневно порядка 50-70 миллиардов клеток. Суммарная масса клеток, которые на

протяжении 1 года жизни подвергаются разрушению, эквивалентна массе тела человека. Восполнение утраченных клеток обеспечивается за счёт пролиферации – увеличения клеточной популяции путём деления.

✓ **Некроптоз** – программируемая некротическая гибель клетки, сопровождаемая активацией рецептора, взаимодействующего с протеинкиназой-3 (receptor-interacting protein kinase 3, RIPK3, RIP3). В отличие от молекулярных путей апоптоза, изучаемых уже много лет, основы некроптоза изучены меньше. На молекулярном уровне при некроптозе происходит строго регулируемая сборка внутриклеточного комплекса, известного как некросома, запускаемая рецепторами смерти (например, рецептором фактора некроза опухоли 1 – tumor necrosis factor receptor – TNFR1), рецепторами лигандов FasL[en] и TRAIL, поверхностными Toll-подобными рецепторами, а также механизмами, распознающими присутствие в цитоплазме вирусных РНК.

Для некроптоза, индуцируемого фактором некроза опухоли (TNF), необходима дальнейшая активация RIPK1[en] (RIP1) и RIPK3[en]. Блокирование этих киназ некростатинами, например, некростатином 1, ингибирующим RIPK1, останавливает некроптоз. В отличие от апоптоза, вызываемого активацией каспазы 8, некроптоз может протекать лишь при инактивации этого фермента. При некроптозе также происходит образование активных форм кислорода в митохондриях, однако, в отличие от апоптоза, не происходит фрагментация ДНК.

Некроптоз может запускаться в тех случаях, когда апоптоз по тем или иным причинам невозможен. Морфологически некроптоз характеризуется набуханием клетки, нарушением работы митохондрий, увеличением проницаемости плазматической мембраны и высвобождением содержимого клетки во внеклеточное пространство.

В обсуждаемом нами аспекте особенно важен тот факт, что в отличие от апоптоза, некроптоз сопровождается сильным иммунным ответом: погибающая клетка высвобождает молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями (DAMP), которые активируют иммунитет. Именно этим обусловлены многие радиобиологические процессы, сопровождающие стереотаксическое облучение.

4.4. Постулаты 4R/5R в свете использования высокодозного облучения

Рассмотрим постулаты 4R/5R в свете использования высокодозного облучения.

I. Репарация (восстановление – repair)

Считается, что нормальная ткань, подвергаясь облучению, способна с меньшими последствиями реагировать на повторяющиеся циклы повреждения ДНК, чем новообразования, что связано с внутренними аберрациями (нарушениями) в системах восстановления повреждений, характерными для опухолевой трансформации. Это явление называется восстановлением сублетальных повреждений (sublethal damage repair – SLDR). Соответственно, мультифракционное облучение позволяет во времени постепенно отделить токсичность нормальных и опухолевых тканей. Небольшие различия в плечевых областях кривых ответа на дозу для различных нормальных тканей и опухолей могут быть увеличены при использовании мультифракционирования малых доз по сравнению с одной или несколькими крупными фракциями.

При реализации SRS/SBRT/SABR количество фракций значительно сокращается, ограничивая подобный дифференцированный ответ, который компенсируется уменьшением повреждения нормальной ткани, в связи с обеспечением высокоточной доставки дозы. При этом возможности восстановления клеток опухоли (репарации) уменьшаются, а токсичность доставленной дозы увеличивается (особенность, связанная с квадратичным β -членом линейно-квадратного уравнения). Период времени для завершения восстановления сублетальных радиационных повреждений в клетках млекопитающих составляет около 30 минут.

II. Реоксигенация (reoxygenation)

Впервые в 1909 году было продемонстрировано, что снижение кровотока приводит к уменьшению распространенности, выраженности и тяжести кожных реакций, вызванных радиацией. В 1955 г. R.H. Thomlinson и L.H. Gray выдвинули предположение, что опухоли содержат долю лишенных кислорода, но все еще репродуктивно жизнеспособных (т.е. «клоногенных») гипоксических клеток и что, если

они сохраняются в течение всего курса фракционированной ЛТ, это отрицательно повлияет на терапевтическое соотношение [106].

Существует показатель, специально разработанный для количественной оценки радиорезистентности гипоксических клеток, по сравнению с обычными – коэффициент кислородного усиления (oxygen enhancement ratio – OER=Radiation dose in hypoxia/Radiation dose in air). Для больших разовых доз облучения типичными были значения OER 2,5-3,0, а для обычной фракционированной ЛТ с использованием повторных небольших фракций, существенно ниже – 1,5-2,0 [62].

Существуют различные типы гипоксии опухоли. Первоначально описанный R.H. Thomlinson и L.H. Gray тип называется хронической или ограниченной диффузией гипоксией (diffusion-limited hypoxia), возникающей при высокой потребности к кислороду и ограниченном кровоснабжении [106]. В регионах с низким содержанием кислорода (0,5% кислорода, или 10 ppm – промилле – O₂) – могут сохраняться клоногенные и радиорезистентные гипоксические клетки. J.M. Brown (1979) описал второй тип гипоксии, острый, или прерывистый тип (acute, intermittent type), вторичный по отношению к аномальной физиологии сосудов и связанный с обтурацией, шунтированием и компрессией сосудов из-за высокого давления интерстициальной жидкости в микроокружении опухоли. Обычно такая гипоксия временна – от нескольких минут до нескольких часов [18, 19, 20, 21].

Опухолевая гипоксия вообще является отрицательным предиктором исхода [59]. Опухолевым тканям свойственна локальная гипоксия (≤ 10 мм рт. ст.). Недостаток кислорода является мощным модификатором дозы, увеличивающим до 3-х раз и более радиационную устойчивость в связи с отсутствием фиксации повреждения свободными радикалами. Обычное фракционирование облегчает реоксигенацию за счет снижения общей потребности в кислороде, поскольку масса опухоли постепенно сокращается при лечении. Остаточные гипоксические клетки могут повторно оксигенироваться в конце цикла лечения и, таким образом, уничтожаться.

Клиническое значение реоксигенации гипоксических опухолевых клеток заключается в увеличении терапевтического соотношения, учитывая, что нормальные ткани остаются хорошо насыщенными кислородом. При проведении обычной фракционированной ЛТ отсутствие реоксигенации опухолей, содержащих даже небольшую долю клоногенных гипоксических клеток, делало бы их практически

неизлечимыми. Теоретически SRS/SBRT должны иметь в этом отношении недостатки, связанные с сокращением времени облучения и количества фракций, необходимых для инициирования и использования реоксигенации [93].

В публикации Z. Fuks (2005) было показано, что крупные фракции (> 10 Гр) активируют быстрый эндотелиальный апоптоз посредством расположенной на мембране кислой сфингомиелиназы (sphingomyelinase), которая высвобождает проапоптотическое соединение – церамид (ceramide) [47]. Подведение начальной крупной фракции может определить реакцию опухоли на последующие фракции путем изменения опухолевой перфузии опухоли и влияния на ее гипоксию.

Вызванное гипоксией повышение HIF1 α /IF1 β транскрипционно активирует VEGF (Vascular endothelial growth factor) – проангиогенный фактор, в дополнение к более широким эффектам, таким как ATM (Ataxia telangiectasia mutated)/ATR (ATM-Rad3-related) – опосредованный мониторинг контрольных точек клеточного цикла и снижение способности восстановления HR (Homologous recombination) посредством подавления RAD51 [24,93].

Радиосенсибилизаторы гипоксических клеток, такие как нитроимидазолы (nitroimidazoles), не получили широкого клинического применения в связи с недостаточной эффективностью, показанной в ряде последних исследований [89, 90]. Возможно их использование при SRS/SBRT окажется более эффективным в связи с сокращением времени лечения и его токсичностью. Учитывая массивное разрушение сосудов в опухолях после облучения высокими дозами, весьма маловероятно, что реоксигенация гипоксических клеток произойдет в течение 2-3 дней после высоких доз SBRT и SRS. Однако вполне возможно, что потребление кислорода резко снизится после массовой гибели опухолевых клеток, и, таким образом, выжившие гипоксические клетки могут подвергнуться повторной оксигенации.

III. Репопуляция (repopulation)

В ключевой публикации, представленной Withers et al. (1985), с анализом клинических данных было продемонстрировано, что при EBRT, в среднем, через 2-3 недели от начала лечения наблюдалась репопуляция (клеточное возобновление) опухоли, в зависимости от фракционирования, доз за фракцию и общих доз, а также морфологического типа опухоли, с повышением радиационной устойчивости.

Это требовало подведения дополнительной дозы для контроля над заболеванием [119, 120, 121]. Эмпирическим средством контроля над репопуляцией опухоли было непрерывное проведение облучения с конвенциональным фракционированием. Нормальные ткани и опухоли, содержащие стволовые клетки, могут начать пролиферировать в течении курса ЛТ и после него, причем срок этого ответа зависит от кинетики пролиферации ткани (во время лечения и до 3 мес. для «рано реагирующих» нормальных тканей и большинства опухолей и более 6-9 месяцев для «поздно реагирующих» тканей). Репопуляция благотворна для нормальных тканей (купирование осложнений ЛТ, например, мукозита) и нежелательна для опухоли (радиорезистентность и риск рецидива). Причиной замедления репарации являются дозозависимые блоки в фазовом переходе клеточного цикла от G2 к M и от G1 к S, причем последний, как правило, более заметен в нормальных клетках, чем в злокачественных. В случае SBRT/SRS ускоренная доставка тумороцидных доз (1-5 фракций в течение 1 недели) предотвращает опухолевую экспансию и репопуляцию, что особенно характерно для быстро делящихся опухолей [93]. Не исключено, что репопуляция опухолевых клеток может начаться раньше при SBRT и SRS, чем при фракционной лучевой терапии, это предположение требует дальнейшего изучения.

IV. Перераспределение (redistribution)

После облучения для пополнения или восстановления баланса опухолевые клетки на стадии G0 клеточного цикла ускоряются до стадии G2/M (радиационно-индуцированная остановка – radiation-induced G2/M arrest), на которой они очень чувствительны к радиации. Остается лишь когорта относительно устойчивых клеток. Следовательно, перераспределение клеточного цикла увеличивает эффективность мультифракционированного EBRT. До настоящего времени так и не удалось в полной мере воспользоваться этим феноменом в связи с наличием субпопуляций опухолевых клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла и отсутствием надежных механизмов их синхронизации. Облучение умеренными дозами замедляет прохождение клеточного цикла через фазы G1 и S и задерживает клетку в фазе G2 дозозависимым образом. Фракции клеток, задержанных в фазе G2, могут успешно завершить митоз и перейти в фазу G1 или погибнуть во время митоза. После облучения различных клеточных линий высокими дозами (20 Гр за 1 фракцию), было об-

наружено, что развитие клеточного цикла замедляется, и многие клетки погибают в фазах цикла, в которых они были облучены, хотя некоторые из облученных клеток медленно развивались до фазы G2, затем погибали. Предполагается, что уменьшение количества фракций увеличивает вероятность облучения когорты клеток, находящихся в радиочувствительной фазе [93].

После высокодозного облучения (особенно 20 Гр и более за фракцию) клеточный цикл полностью блокируется на всех фазах, следовательно, перераспределение опухолевых клеток невозможно, поскольку как чувствительные, так и нечувствительные опухолевые клетки погибают.

V. Радиочувствительность (radiosensitivity)

Выше уже было акцентировано, что еще на заре развития радиотерапии были замечены существенные различия в радиочувствительности различных клеток и тканей.

В 1984 г. J. Deacon et al., обобщили основные данные в этом отношении в обзоре, показав, что существует 5 основных групп опухолей по их радиочувствительности [30, 87]:

- А) нейробластома, лимфома, миелома;
- Б) медуллобластома, мелкоклеточный рак легких;
- В) рак молочной железы, мочевого пузыря, шейки матки;
- Г) рак поджелудочной железы, колоректальный и плоскоклеточный рак легких.

Различия в радиочувствительности опухолевых клеток имеют существенное значение при небольших разовых дозах, свойственных конвенциональному фракционированию. В то же время использование больших доз при SRS/SBRT показывает, что в экспоненциальной части кривой доза-ответ влияние индивидуальной радиочувствительности стирается.

Крупные фракции и короткое время облучения предотвращает селекцию стволовых клеток, часто обнаруживаемых в солидных опухолях и наиболее устойчивых к радиации, благодаря усиленной репарации ДНК, вторичной по отношению к усилению функции контрольных точек клеточного цикла CHK1/2 [14, 93].

Некоторые возможные теоретические преимущества и недостатки высокодозного гипофракционированного облучения перед обычным с радиобиологической точки зрения, представлены в таблице 2.

Преимущества и недостатки SRS/SBRT перед EBRT
с радиобиологической точки зрения
(адаптировано из Sethi R.A. et al., 2016) [93]

Параметр	Недостатки SRS/SBRT	SRS/SBRT преимущества
Репарация Repair	Ограничивает количество циклов повреждения и восстановления, которое отделяет ответ опухоли от токсичности для нормальной ткани.	Улучшенное нацеливание на опухоль снижает дозу на нормальные ткани и необходимость в их сохранении путем фракционирования.
Реоксигенация Reoxygenation	Меньшее количество циклов лечения потенциально снижает межфракционную реоксигенацию и, таким образом, увеличивает радиорезистентность	Нет
Репопуляция Repopulation	Нет	Значительно снижает или устраняет репопуляцию опухоли во время более короткого лечения, что особенно актуально для стволовых клеток опухоли, устойчивых к радиации.
Перераспределение Redistribution	Уменьшение количества фракций влияет на распределение оставшихся жизнеспособных клеток в клеточном цикле. Перераспределение может повышать эффективность фракционированной ЛТ на определенных этапах клеточного цикла, однако убедительно клиническое значение не доказано.	
Радиочувствительность Radiosensitivity	Нет	Мультилогарифмическое уничтожение клеток снижает вариабельность радиочувствительности опухоли, которая в первую очередь наблюдается в плечевой области кривой выживаемости клеток. Доза более 10 Гр может вызывать апоптоз эндотелиальных клеток.

Глава 5. Основные модели радиобиологии

Опухолевый ответ на ионизирующее излучение реализуется посредством трех механизмов:

а) прямое цитотоксическое повреждение опухолевых клеток, вызванное повреждением ДНК, которое происходит как при низких, так и при высоких дозах на фракцию;

б) непрямая гибель опухолевых клеток, которой предшествует повреждение сосудов и эндотелиальных клеток, преимущественно при высоких дозах за фракцию;

в) непрямая гибель опухолевых клеток за счет подключения иммунных механизмов.

Таким образом, в широкой трактовке на современном этапе описание основных понятий и постулатов радиационной биологии можно свести к нескольким взаимосвязанным моделям:

1. Линейно-квадратичная модель (linear-quadratic model – LQ) выживания клеток и ее модифицированные варианты.

2. Сосудистая модель.

3. Радиоиммунобиологическая модель.

4. Модель немишеных эффектов (описывается на стыке линейно-квадратичной, сосудистой и иммунной моделей) [1].

5.1. Линейно-квадратичная модель (Linear-quadratic model – LQ-модель)

Рассмотрим линейно-квадратичную модель (linear-quadratic model – LQ) выживания клеток и ее модифицированные варианты.

5.1.1. Модели выживания клеток и проблемы изоэффекта

Основные понятия и постулаты радиационной биологии были разработаны до появления современных лучевых технологий (IGRT, IMRT, VMAT), когда помимо мишени и нормальные ткани получали значительные дозы во время длительных курсов фракционированного облучения.

При использовании фракционированной ЛТ сразу возникла проблема – различия эффективности лечения в зависимости от количе-

ства фракций, времени между ними, общей дозы и продолжительности лечения и т.д. Изначально были созданы эквиваленты временных доз для эритемы кожи, позже они легли в основу расчета эквивалентов для других нормальных тканей и опухолевых реакций. Путем построения общей дозы, необходимой для определённого эквивалента в конкретной ткани, в зависимости от одного из переменных параметров лечения может быть получена так называемая кривая «изоэффекта».

Какая история вопроса, можно отметить, что серьезно анализировать осложнения при проведении ЛТ в нормальных тканях и их тяжесть в зависимости от общей дозы начали в 1930-х годах. Первые разработки количественного анализа изменений в дозовом фракционировании и первые кривые изоэффекта были получены М. Strandqvist и L. Cohen в 1944 году в виде графика в логарифмической шкале общей дозы в зависимости от общего времени лечения. В 1966-69 гг. F. Ellis сформулировал концепцию константы пропорциональности, связанной с переносимостью тканей, в которой более существенное влияние на эффект оказывало количество фракций по сравнению с общим временем лечения.

Вообще, до появления линейно-квадратичной использовались 3 основные модели (линейные гипотезы):

1. **Модель Страндквиста** (Strandqvist Magnus, 1944). Зависимость толерантности кожи к дозе облучения для конкретного времени лечения рака кожи построена с использованием логарифмической кривой. Наклон этой кривой постоянен и равен 0,22 для рака кожи и 0,33 для эритемы. Модель предполагала, что допустимая фракционная доза была связана со временем лечения T как $T_{0,33}$ [100].

2. **Модель NSD Эллиса** (Ellis F., 1966) – учитывает зависимость допустимой дозы от количества фракций и общего времени лечения. NSD (nominal standard dose – номинальная стандартная доза) – это доза, необходимая для максимального повреждения опухоли без превышения уровней переносимости здоровых тканей.

$$D = NSD * N^{0,24} * T^{0,11};$$
$$NSD = D * N^{-0,24} * T^{-0,11},$$

где D – суммарная доза за весь курс лечения на уровне кожи; NSD – номинальная стандартная доза; N – фракционная доза и T – общее

время лечения в днях, 0,11 и 0,24 – факторы восстановления, характеризующие скорость репарации, рассчитанные экспериментально (угол наклона кривых Strandquist). NSD – коэффициент, характеризующий толерантную дозу при однократном облучении. Согласно формуле, биологический эффект обусловлен величиной суммарной очаговой дозы (СОД), продолжительностью курса и числом фракций. Толерантность всех органов и тканей признавалась F. Ellis равноценной толерантности соединительной ткани, а ее предел достигается при $NSD=1800\pm 200$, когда вероятность риска лучевых повреждений здоровых тканей не превышает 5% при площади облучения 100 см^2 [10].

3. **Модель Ортона-Эллиса** (C. Orton et F. Ellis, 1973). Это модифицированная NSD модель, известная как модель TDF, или ВДФ (time-dose factor; фактор время-доза-фракционирование):

$$TDF=d^{1,538}\cdot X^{-0,169}\cdot 10^{-3},$$

где X – время лечения/количество фракций; d – количество фракций. Эта модель стала логическим продолжением NSD. С. Orton в 1970 годах показал, что концепция NSD имела ряд ограничений: число фракций 4-30, непрерывный курс лечения, модель не учитывала величину облучаемого объема и не предназначалась для неклассических режимов фракционирования.

Модель, как и NSD, описывала толерантность нормальной соединительной ткани. Было установлено, что графики выживаемости клеток имеют характерный вид S-образных кривых, а ответная реакция на облучение у разных видов тканей проявляется в отличающееся время после воздействия, на основании чего их разделили на рано- и поздно реагирующие [81, 82]. Главная идея – если полная толерантность тканей не исчерпана, то при альтернативных режимах фракционирования, при расщепленных курсах и при брахитерапии можно пользоваться понятием частичной толерантности. Модели NSD и ВДФ широко использовались в мире и в СССР, но в настоящее время имеют преимущественно историческое значение [10].

Долгое время использование взаимных доз считалось запутанным и громоздким, исследователи предпочитали именно кривые изоэффекта, (например, Страндквиста). Так, H.D. Thames, H.R. Withers, и L.J. Peters повторили эксперименты по фракционированию на грызунах, в виде логарифма общей дозы по оси y и логарифма до-

зы на фракцию по оси x , причем эта ось была перевернута, чтобы лучше соответствовать исходным кривым Странквиста (где использовалось общее время, а не доза за фракцию) [103, 118, 119, 120, 121]. При построении таким образом – кривые изоэффекта для нормальных тканей с поздним ответом были более крутыми, чем для нормальных тканей с ранним ответом, и для большинства опухолей. Крутая кривая изоэффекта подразумевала большую чувствительность к изменениям дозы за фракцию, большую сохранность при уменьшении размера фракции (т.е. более высокая допустимая доза для изоэффекта) и большее повреждение при увеличении размера фракции (т.е. более низкая допустимая доза для изоэффекта).

Менее крутая кривая изоэффекта предполагала меньшую чувствительность к изменениям дозы за фракцию, то есть меньшее «колебание» допустимых доз при изменении размера фракции. В целом, эти математические модели позволили рассчитать биологические эквиваленты для различных режимов облучения. Однако поскольку они были основаны на ранних кожных реакциях, то оказались плохо приспособлены для моделирования поздних осложнений в нормальных тканях. При этом, с появлением оборудования для ЛТ с мегавольтным напряжением, которое позволяло лечить глубоко расположенные опухоли, именно повреждение внутренних органов, а не кожи, стало ограничивающим дозу [62].

V.G. Douglas et J.F. Fowler (1976) провели эксперименты по мультифракционированию на мышах, в которых использовался широкий диапазон размеров фракций, их количество и интервалы, а также оценивались острые кожные реакции [36]. Был разработан новый метод интерпретации данных на основе кривых изоэффекта, получивший название «график обратной, взаимной дозы» (reciprocal dose plot), где обратная величина общей доставленной дозы строилась как функция дозы.

Помимо описанных были разработаны и другие модели: «single-target, single-hit» и «multitarget-single-hit model» (Lea, 1946, 1955), «amorphous track structure model» (Katz, 60-е годы), «the theory of dual radiation action» (Kellerer, Rossi, 1972), «Lyman-Kutcher-Burman model» (Kutcher, Burman, Emami, 1991), «relative seriality model» (Kallman, Agren, Brahme, 1992), «critical volume model» (Niemierko, Goitein, 1993), «critical element-like model» (Shirato, 1995), «variable critical volume model» (Bontaet et al., 2001), «empirical tolerance dose-volume model» (van Luijk, 2004). Продолжают создаваться сложные

многофакторные компьютерные программы с интегральными алгоритмами, моделирующими исходы лучевой терапии, например, программа с открытым исходным кодом DREES [10].

Практически сразу было отмечено, что эти линейные гипотезы оказались во многих случаях несостоятельными, и для математического моделирования были предложены *квадратическая и линейно-квадратическая* гипотезы.

Квадратическая гипотеза количественно описывает фракцию выживания как функцию квадрата дозы. Эта гипотеза носит весьма ограниченный характер и используется в очень редких случаях.

Линейно-квадратическая гипотеза базируется на предположении о существовании 2 компонент (α/β), определяющих гибель клеток – одна из них пропорциональна дозе (линейная компонента – αD), другая (квадратическая – βD^2) – квадрату дозы. При этом обе компоненты могут быть обусловлены одними и теми же клеточными повреждениями и зависят от дозы, типа и интенсивности облучения, а не являются следствием сосуществования двух независимых процессов повреждения.

Первыми основные положения *линейно-квадратичной модели* (ЛКМ – linear-quadratic model – LQ-модель) в 1942 году описали D.E. Lea и D.G. Catcheside. Изначально она представляла собой эмпирическую формулу, используемую для соответствия наблюдаемой кривой выживаемости клеток и содержала два компонента уничтожения клеток: линейный и квадратичный. Позже были включены эффекты мощности дозы, фракционирования и восстановления сублетальных повреждений. Знаковыми теоретическими этапами, с обоснованием модели и математическим описанием радиобиологических эффектов были публикации К.Н. Chadwick и Н.Р. Leenhouts (1981) и F. Ballarini (2010).

Модель LQ заложила основу для исследования изоэффектов облучения, которые описывают взаимосвязь между дозой, временем, размером фракции и клиническим эффектом излучения. Затем она была расширена для моделирования эффектов 4R/5R. ЛКМ позволяет рассчитывать более адекватные значения эквивалентных (изоэффективных) толерантных доз для различных тканей по поздним лучевым повреждениям, чем формула номинальной стандартной дозы (НСД) или ее модификации.

Известно, что процесс ионизации структур клетки носит стохастический характер. Для инактивации клетки при действии плотно ионизирующих излучений (например, α -частиц), как правило, бывает достаточно реализации одного события – попадания частицы в ядро клетки и повреждения структуры ДНК. Экспериментальные точки аппроксимируются прямой, проходящей через начало координат, поскольку репарация (ДНК и других структур) при подобных экспозициях практически отсутствует.

Кривые выживаемости клеток различных тканей доза-эффект при действии плотно ионизирующего излучения не имеют плеча и описываются экспоненциальной зависимостью от дозы:

$$N=N_0\exp(-D/D_0), \text{ или } N=N_0e^{D/D_0}$$

где D_0 – параметр, характеризующий радиочувствительность ткани, определяется как приращение дозы, снижающей выживаемость объектов в e раз на прямолинейном участке.

Для редко ионизирующих излучений экспериментальные точки невозможно аппроксимировать прямой линией. Выживаемость клеток сначала снижается медленно, но с нарастанием дозы скорость снижения увеличивается, после чего остается постоянной. Пологий отрезок кривой доза-эффект называется плечом, крутой – линейным участком. Эта зависимость объясняется необходимостью воздействия нескольких порций энергии с небольшой линейной передачей для поражения мишени. Если экстраполировать прямолинейную часть зависимости доза-эффект на ось ординат, то точка пересечения покажет, сколько таких порций энергии необходимо (экстраполяционное число « n »). Дополнительно может использоваться показатель «размера плеча» D_q , численно равный дозе, при которой ось абсцисс пересекается с экстраполированным участком прямолинейной части дозовой кривой: $D_q=D_0 \ln 2$. Наклон линейной части кривой доза-эффект (D_0), отражает радиочувствительность клеток, а экстраполяционное число n – способность клеток к восстановлению (репарации).

Уравнение для аппроксимации кривых доза-эффект при действии редко ионизирующего излучения имеет вид:

$$N=N_0-N_0(1-e^{D/D_0})^n,$$

где N – число выживших клеток из общего их числа N_0 ; D – доза излучения; D_0 – доза, при которой доля живых клеток уменьшается в

сравнении с исходной в e раз на прямолинейном участке кривой доза-эффект.

Таким образом, для большей наглядности и простоты определения параметров (характеристик) кривую дозовой зависимости выживаемости клеток обычно представляют в полулогарифмических координатах: по оси абсцисс – доза в линейном масштабе, по оси ординат – доля выживших в логарифмическом масштабе клеток, не потерявших клоногенной (колониеобразующей) способности. В общем случае кривая выживаемости клеток в полулогарифмическом масштабе состоит из двух участков: т.н. «плеча» («плеча репарации») и линейного участка – простой экспоненты, как логарифм выживаемости в зависимости от дозы. «Плечо» сигмоидной кривой – это мера способности клеток к репарации, оно отражает:

1) период накопления сублетальных повреждений до уровня, необходимого для потери репродуктивности;

2) наличие процессов репарации после радиационного воздействия;

3) становится менее выраженным по мере нарастания дозовой нагрузки. Кривые доза-эффект при действии плотно и высокодозного излучения не имеют плеча (вторая, прямая линия на графике – рисунок 2).

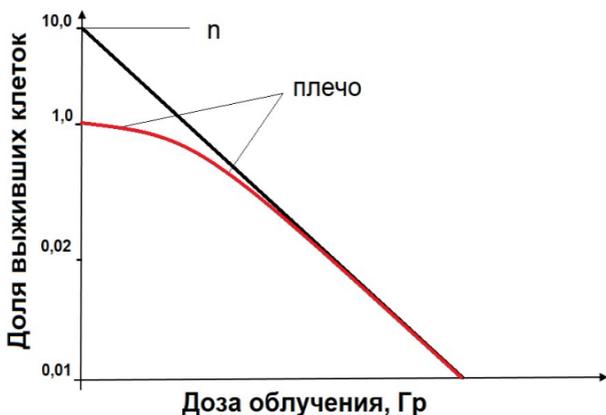


Рис. 2. Кривые доза-эффект при действии излучения (полулогарифмические координаты): n – экстраполяционное число, определяемое как значение ординаты в месте ее пересечения экстраполированным прямолинейным участком кривой.

5.1.2. Линейно-квадратичная модель и линейно-квадратичное уравнение

Линейно-квадратичная интерпретация кривых выживаемости клеток была разработана в эпоху обычного (не высокодозного) фракционирования для оценки реакции опухолей и поздно реагирующих нормальных тканей на изменения в схемах фракционирования, когда доля выживших клеток (SF) связана с дозой D через линейные и квадратичные компоненты.

Линейно-квадратичная модель и линейно-квадратичное уравнение для кривых выживаемости (SF) клеток опухолей человека и описания изозффектов облучения (LQ-модель) рассчитывается по формуле:

$$SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2), \text{ или } -\ln(SF) = \alpha D + \beta D^2,$$

где D – поглощенная доза ионизирующего излучения; α и β – эмпирические коэффициенты.

Выделение в формуле двух членов опирается на фундаментальный молекулярный механизм воздействия ионизирующего излучения на биообъекты. Линейная компонента [$\exp(-\alpha D)$] могла бы быть обусловлена одноклеточными (или одноударными) событиями, в то время как квадратичную компоненту [$\exp(-\beta D^2)$] можно связать с двухклеточными (или многоударными) событиями. Такая интерпретация поддерживается результатами исследований эффекта мощности дозы, которые показывают, что при ее уменьшении кривая выживаемости приближается к прямой. Поэтому интересно сравнить вклад обоих членов в величину SF. Различие в радиочувствительности разных клеточных линий практически целиком связано с линейной компонентой. Отсюда можно сделать вывод, что уничтожение клоногенных клеток при клинически реалистичной дозе за фракцию обусловлено линейной компонентой кривой выживаемости клеток [2, 4].

ЛКМ представляет собой математическое объяснение того, как для данной популяции клеток «выжившая клеточная фракция» (surviving cell fraction – SCF) связана с дозой облучения. В LQ модели SCF при данной дозе зависит от двух переменных, специфичных для клеток: при низких дозах SCF линейно уменьшается с увеличением дозы, и наклон в этом диапазоне может быть представлен как $-\alpha$. При нарастании дозы, после достижения определенного уровня, SCF начинает уменьшаться быстрее, в зависимости как от дозы, так и от квадрата дозы – это и составляет квадратичную часть модели. Соответ-

ственно, конечная часть кривой имеет наклон $-\beta$, и общая зависимость SCF от общей дозы составляет: $SCF = \exp[-\alpha D - \beta D^2]$ [107-110].

5.1.3. Соотношение α/β

Значения параметров α и β определяются по кривым выживаемости стволовых клеток. Определить величину этих параметров отдельно для клеток в составе ткани невозможно, но возможна оценка отношения α/β при равно эффективных режимах. Отношение α/β измеряется в греях (Гр – Грей – Грэй – Gy – Gray) и численно соответствует дозе, при которой линейная функция, характеризующая гибель клеток αD , эквивалентна квадратичной βD^2 . Эта модель адекватно описывает реакции клеток на облучение в дозах, не превышающих 5-6 Грей. То есть из 2 компонент, определяющих гибель клеток – одна из них пропорциональна дозе (линейная компонента), другая (квадратическая) – квадрату дозы. Считается, что гибель клеток, обусловленная одномоментными двойными разрывами ДНК, характеризуется линейной функцией (α), а квадратичная часть уравнения (β) описывает связь гибели клеток с разрывами спиралей ДНК за счет накопления одиночных разрывов, что согласуется с известными летальными молекулярными абберрациями, вызванными ионизирующим излучением.

До сих пор распространено неправильное представление о том, что соотношения α/β в LQ определены из кривых выживаемости клеток. На самом деле они получены из мультифракционных экспериментов *in vivo* и являются отражением составной кривой зависимости дозы, которая, была дополнительно изменена под влиянием 4R/5R. Эти кривые не являются количественными в том же смысле, что и кривые выживаемости клеток. Более крутой начальный наклон в области низких доз для тканей с высоким соотношением α/β (ранние реагирующие нормальные ткани и большинство опухолей) объясняет их пониженную чувствительность к изменениям дозы за фракцию. И наоборот, меньший начальный наклон для поздно реагирующих нормальных тканей и немногих опухолей с низким соотношением α/β объясняет их высокую чувствительность к изменениям дозы за фракцию. В модели LQ кривая отклика должна «изгибаться» вниз по мере увеличения дозы, и именно в этом изгибе определяется соотношение α/β или доза, при которой вклад каждого компонента (линейный и квадратичный) равен. Для тех типов клеток, которые

рано реагируют и более чувствительны к невысоким дозам излучения, соотношение α/β больше [62].

Лучевые повреждения поздно реагирующих тканей (соединительная ткань, головной и спинной мозг, легкие, сердце) в большей степени зависят от дозы за фракцию, а для рано реагирующих тканей и большинства опухолей более существенную роль играет общая длительность курса лучевой терапии и суммарная доза.

Различные режимы фракционирования не могут быть одновременно эквивалентны по ранним и по поздним лучевым повреждениям. Для рано реагирующих нормальных тканей (острые реакции), а также многих опухолей значения α/β составляют 7-16 Гр. Для некоторых злокачественных новообразований и поздно реагирующих нормальных тканей величины отношения α/β значительно ниже (1,7-6 Гр). Отношение α/β для конкретной ткани, демонстрирует большие доверительные границы. Со временем было установлено, что соотношения α/β , как правило, были низкими для тканей с поздним ответом (от 1 до 6 Гр, в среднем около 3 Гр) и высокими для тканей и опухолей с ранним ответом (от 7 до 20 Гр, в среднем около 10 Гр). При расчетах часто используют усредненные значения: 1) 10 Гр – для ранних повреждений и 2) 2,5 Гр для поздних повреждений. Однако стоит отметить, что из этих общих тенденций есть исключения, в частности, рак предстательной железы и рак молочной железы обычно имеют низкие соотношения α/β , а их чувствительность к фракционированию больше похожа на чувствительность поздно реагирующих нормальных тканей.

Некоторые соотношения α/β для нормальных тканей человека показаны в таблице 3 [60, 62].

Таблица 3

Некоторые соотношения α/β
(адаптировано из Joiner and van der Kogel, 2018) [60]

Тип ткани и эффект	α/β $\pm 95\%$ CI (Гр)	Авторы
Рано реагирующие нормальные ткани	Кожа	
	Эритема	
	Десквамация	
	Легкое: пульмонит ≤ 90 дней после ЛТ	
	Мукозит полости рта	8-15
Поздно реагирующие	Кожа Телеангиэктазии	$\sim 2,7 (-0,1; 8,1)$

нормальные ткани	Фиброз	1,7 (0,6; 3,0)	
	Молочная железа		
	Косметические дефекты	3,4 (2,3; 4,5)	
	Фиброз	3,1 (1,8; 4,4)	
	Легкое		
	Пневмония >90 дней после ЛТ Фиброз	4,0 (2,2; 5,8) 3,1 (-0,2; 8,5)	
Кишечник			
Перфорации/ стриктуры	3,9 (2,5; 5,3)		
Другие осложнения	4,3 (2,2; 9,6)		
Спинальный мозг:			
миелопатия	<3,3 Гр		
Опухоли	Голова и шея		Harrison et al., 1988;
	Голосовые связки	~9,9-13	Withers et al., 1995;
	Миндалины	7,2 (3,6; ∞)	Rezvani et al., 1993;
	Гортань	14,5 (4,9; 24)	Robertson et al., 1993;
	Ротоглотка	16	Maciejewski et al., 1989;
	Слизистая полости рта	6,6-25	Byhardt et al., 1977; Cox
	Носоглотка	10,5-16	et al., 1980; Hia et al., 1980; Lee et al., 1995;
	Глиобластомы	8,3	Tubiana et al., 1990;
	Дифференцированные	4,4	Stuschke et al., 1995;
	Недифференцированные	17,8	Stuschke et al., 1995
	Легкое:		
	Немелкоклеточный рак	~50-90	Cox et al., 1980
	Мелкоклеточный рак	8	Tubiana et al., 1990
	Шейка матки:		
	плоскоклеточный рак	>13,9	Watson et al., 1980
Кожа:			
плоскоклеточный рак	8,5 (4,5; 11,3)	Trott et al., 1984	
Злокачественные лимфомы	8,8	Tubiana et al., 1990	
Меланома	0,6 (0; 2,5)	Bentzen et al., 1989 Tubiana, 1990	
Саркома			
Липосаркома	0,4 (-1,4; 5,4)	Thames, Suit, 1986	
Мягкотканная	7-8 (4,6-10,3)	Stuschke et al., 1995	
Предстательная железа	1,8 (-3,3; 5,6)	Haustermans et al., 2004; Wang et al., 2003; Brenner, Hall, 1999; Fowler et al., 2001	
Молочная железа			
Дифференцированные	4,6 (1,1; 8,1)	Stuschke et al., 1995	
Недифференцированные	23,3	Stuschke et al., 1995	
Аденокарцинома прямой кишки	7-12	Withers, Haustermans, 2004	

5.1.4. Биологически эффективные дозы (Biologically Effective Doses - BEDs)

Альтернативными моделями, базирующимися на ЛКМ являются BED – биологически эффективная доза и TE – общий эффект. Концепции биологически эквивалентной дозы и терапевтического отношения основаны на экспериментах, в которых кривые выживаемости были получены путем облучения различных типов клеток *in vitro* и *in vivo*.

Вообще, биологически эффективная доза (BED – biologically effective dose) – это теоретическая, экстраполированная общая доза для достижения, определенного изоэффекта, привязанная к соотношению α/β ткани.

BED используются для сравнения и сопоставления различных режимов ЛТ в отношении изменений толерантности нормальных тканей и контроля опухоли.

Поскольку BED являются теоретическими, а не фактическими дозами, они выражаются в других единицах, например, Gy₃ или Gy₁₀, с подстрочным индексом, определяющим, какое соотношение α/β использовалось для его получения. Соответственно, их можно качественно сравнить только друг с другом (Gy₃ с Gy₃, или Gy₁₀ с Gy₁₀, но не между собой) [62].

Чтобы уравнять различные схемы фракционирования и дозы и была создана концепция BED, которая в простейшей форме позволяет рассчитать различия в ответах тканей или опухолей из дробной части дозы d , доставленной n раз:

$$BED = nd(1 + d/(\alpha/\beta)), \text{ или } BED_{\alpha/\beta} = D [1 + d/(\alpha/\beta)],$$

где D – общая доза, а d – доза за фракцию. Средние значения отношения α/β часто принимаются равными 3 (Гр₃) для поздно реагирующих тканей или 10 (Гр₁₀) для острых ответов, характерных для большинства опухолей. Из формулы следует, что по мере увеличения дозы за фракцию происходит увеличение BED, тем больше, чем ниже соотношение α/β . Это позволяет предположить, одна и та же общая доза, подведенная однократно, будет более токсична для нормальной ткани, чем при использовании фракционированных режимов.

Формы кривых изоэффекта тканей и опухолей и связанные с ними соотношения α/β могут быть использованы для выравнивания графиков лечения с использованием разных доз за фракцию, соот-

ветствующих вероятности возникновения конкретного осложнения. Для этого может быть использовано уравнение:

$$D2/D1 = (\alpha/\beta + d1)/(\alpha/\beta + d2),$$

где $D1$ и $d1$ – это, соответственно, общая доза и доза на фракцию основного лечебного плана, а $D2$ и $d2$ – аналогичные параметры альтернативного, биологически эквивалентного плана [63, 109].

5.1.5. Модифицированные линейно-квадратичные модели при высокодозном облучении (Dose-Effect Relationship Models in SRS/SBRT/SABR)

Технологии IGRT, SRS/SBRT за счет увеличения размеров фракций и лучшего распределения дозы в опухоли и нормальной ткани привели к несоответствиям при попытке идентифицировать биологически эквивалентные дозы обычного фракционирования с дозами, полученными с помощью SRS/SBRT. Основная проблема заключается в том, что формула LQ описывает непрерывно изгибающуюся кривую доза-ответ (компонент βD^2), тогда как чаще всего наблюдается простой экспоненциальный ответ, следующий за начальной плечевой областью.

Таким образом, используя уравнение ЛКМ для прогнозирования BED при SRS/SBRT, можно потенциально переоценить токсичность лечения [93].

Выбор оптимальных схем фракционирования и доз за фракцию оказывает прямое влияние на радиобиологический результат, т. е. SCF и токсичность, определяя терапевтическое соотношение. Адекватное моделирование ответа позволяет определить допустимый для облучения в данной дозе объем нормальной ткани до возникновения неприемлемого риска токсичности. На основе использования различий в соотношении α/β существует потенциал для сохранения оптимально высокой BED в опухоли при минимальных ее значениях в нормальной ткани. Например, при использовании 3 режимов: 15 Гр в одной фракции, 21 Гр в трех фракциях и 25 Гр в пяти фракциях – BED10 ($\alpha/\beta=10$) составит 35,7-37,5 Гр, а BED2 ($\alpha/\beta=2$) – 127,5 Гр, 94,5 Гр и 87,5 Гр соответственно. Таким образом, сопоставимый контроль опухоли ($\alpha/\beta=10$) сочетается с $\approx 30\%$ уменьшением BED в нормальных тканях.

Некоторые репрезентативные значения BED для обычных, гиперфракционированных и гипофракционированных режимов ЛТ представлены в таблице 4 [62].

Таблица 4

Значения BED для обычных, гиперфракционированных и гипофракционированных режимов ЛТ (адаптировано из Kaidar-Person O.) [62]

Доза	BED	Фракционирование
30×2 Гр=60 Гр	BED 72 Гр ₁₀ и 100 Гр ₃	Конвенциональное
35×1,8 Гр=63 Гр	BED 74,3 Гр ₁₀ и 100,8 Гр ₃	
68×1,2 Гр=81,6 Гр	BED 91,4 Гр ₁₀ и 114 Гр ₃	Гиперфракционирование
70×1,15 Гр=80,5 Гр	BED 89,8 Гр ₁₀ и 111,4 Гр ₃	
20×2,8 Гр=56 Гр	BED 71,7 Гр ₁₀ и 108 Гр ₃	Гипофракционирование
16×3,4 Гр=54,4 Гр	BED 73 Гр ₁₀ и 116,1 Гр ₃	
3×15 Гр=45 Гр	BED 112,5 Гр ₁₀ и 270 Гр ₃	

Не существует согласованного мнения о том, до какого уровня дозы радиобиологические эффекты адекватно описываются LQ-моделью. Диапазон таких доз по данным разных авторов составляет 3-5-6-10 Гр за фракцию. При более высоких дозах выживаемость клеток лучше описывается другими математическими моделями, например, кубической.

Большинство исследователей считают, что при высокодозных режимах облучения (более 10 Гр) биологические эффекты не согласуются с LQ моделью и предлагают переосмыслить их характер, формулируя «новую радиобиологию – new radiobiology». Эта концепция смещает радиобиологическую парадигму в сторону определяющей роли сосудистых и иммунных механизмов. В частности, этому посвящен цикл работ, выполненных в 3-х ведущих университетах США (Stanford, Yale и Columbia University) в 2010-2014 гг. [18-21, 116]. При дозах за фракцию менее 8 Гр ряд авторов считает ЛКМ ограниченно применимой, но с индивидуальными оговорками в зависимости от характера, локализации опухоли и окружающих тканей.

5.1.6. Основные модификации ЛКМ

Неоднократно было отмечено, что клиническая эффективность SRS/SBRT существенно превосходит ожидания, построенные на классической LQ модели и традиционных радиобиологических принципах, определяющих фракционирование.

Репарации сублетальных повреждений ДНК практически не происходит, большинство из них летальны. Перераспределение клеток в клеточном цикле и реоксигенация также не имеют существенного значения в связи с коротким периодом облучения. Процесс репопуляции клеток после стандартной ДЛТ занимает промежуток времени в 2-3 недели, в то время как при SRS/SBRT реализуется за 1-5 дней [87].

Был предложен ряд моделей, устраняющих несоответствие BED обычного фракционирования с дозами, полученными с помощью SRS/SBRT. Однако всякий раз полученный результат BED следует рассматривать только как ориентировочный. При возникновении сомнений, связанных с токсичностью нормальных тканей при SRS/SBRT следует соблюдать эмпирически установленные ограничения доз и допуски из литературы [93].

➤ **Кубическая модель.** При высокодозном облучении зависимость выживаемости клеточной фракции от дозы на графике становится более линейной, чем при описании ЛКМ. Было предложено включить в формулу компонент, зависящий от дозы, возведенной в третью степень (кубический компонент). Модификацию модели назвали линейно-квадратично-кубической (linear-quadratic-cubic model – LQC) Соответственно, конечная формула приобрела вид:

$$-\ln(S) = \alpha D + \beta D^2 - \gamma D^3 \quad [112].$$

➤ **Экстраполяционная доза ответа** (Extrapolated Response Dose – ERD) (Barendsen G.W., 1982). Вычисляется величина RE – relative effectiveness per unit dose – относительная эффективность единичной дозы, которая зависит от α/β по формуле:

$$RE = 1 + d/(\alpha/\beta),$$

где d – доза за фракцию (Гр). Величины ERD и RE связаны с суммарной дозой (D) соотношением $ERD = D \cdot RE$.

➤ **Фактор дозирования фракционирования** (Fractionation dosage factor – FDF) (Thames H.D. и Hendry J.H., 1987). Эффект фракционированной ЛТ описывался уравнением:

$$E=D \cdot (\alpha/\beta + d),$$

где D – суммарная доза, названная авторами дозовым фактором, а $(\alpha/\beta + d)$ фактором фракционирования.

➤ **Линейно-квадратичная эквивалентная доза для фракций 2 Гр (Linear-quadratic equivalent dose for 2 Gy fractions - LQED2)** (Fowler J.W., Steel C., 2002). ERD была переименована в BED. То есть $BED = D \cdot [1 + d/(\alpha/\beta)]$. Так как BED происходит от ERD, то она является просто математическим понятием – дозой при бесконечно большом количестве бесконечно малых РОД. Предполагается, что режимы лучевой терапии изоэффективны между собой, если им соответствует одинаковое значение BED. То есть: $D[1 + d/(\alpha/\beta)] = D_1[1 + d_1/(\alpha/\beta)]$. Результирующее простое изоэффективное соотношение имеет вид: $D/D_1 = (d_1 + \alpha/\beta)/(d + \alpha/\beta)$. Если в уравнении в качестве d_1 взять стандартную дозу за фракцию, равную 2 Гр, то получается простой метод сравнения эффективности режимов фракционирования, имеющих различные полные дозы и дозы за фракцию. Происходит конвертирование каждого режима в эквивалентный режим по 2 Гр за фракцию, дающий такой же биологический эффект. Итоговая формула имеет вид:

$$EQD_2 = D(d + \alpha/\beta)/(2 + \alpha/\beta),$$

где EQD_2 – полная доза стандартного режима по 2 Гр за фракцию, которая биологически эквивалентна полной дозе D , передаваемой в режиме с фракционной дозой, равной d_1 . Значения EQD_2 могут численно суммироваться для отдельных частей режима облучения, это простой и удобный инструмент расчета изоэффективности режимов облучения, особенно при использовании специальных компьютерных программ (RadioModels, Javier Villatruella, MD, RadioModels, RadOncResource, RadOncReference). Некоторые из этих программ позволяют рассчитывать NTCP для различных объемов OAR, учитывать перерывы в лечении, а при определении BED учитывать репопуляцию в нормальных тканях и в опухолях. Модель следует использовать совместно с инструментами QUANTEC (Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic) и Emami's paper (основополагающая статья В. Emami et al., 1991) [10].

➤ **Модель потенциально летального смертельного исхода (lethal-potentially lethal - LPL).** В 2003 г. Y. Fan и B. Paliwal высказали мнение, что более подходящей при стереотаксическом облучении представляется модель потенциально летального смертельного исхода (lethal-potentially lethal – LPL), предложенная S.B. Curtis (1986), которая вводит поправку λ , среднее расстояние между ионными кластерами или биохимическими структурами на треке. LPL можно охарактеризовать четырьмя параметрами: η_L и η_{PL} (количество смертельных и потенциально смертельных поражений клеток в единицу времени), $T_{1/2} = \ln 2/\lambda$ (период полувыведения для восстановления) и ε (соотношение $\lambda/\varepsilon_{2PL}$ with ε_{2PL} – скорость, с которой потенциально смертельные поражения взаимодействуют, образуя смертельное поражение). Режим низкой дозы/низкой мощности дозы LPL может быть описан моделью LQ с $\alpha = \eta_L$ и $\beta = \eta_{PL}^2/2\varepsilon$ [29, 41].

➤ **Модифицированная LQ модель M. Guerrero.** В 2004 году, M. Guerrero и X.A. Li предложили использовать для описания радиобиологических эффектов при высокодозной гипофракционированной стереотаксической ЛТ модифицированную LQ модель (modified LQ model – MLQ). Модель MLQ по существу отображает модель LPL как при высоких, так и при низких дозах, но сохраняет простоту модели LQ и использует хорошо известные параметры α и β . Авторы рассматривали LQ модель при воздействии постоянной мощности дозы с коэффициентом удлинения дозы G. Доля выживших клеток составляла:

$$S = \exp(-\alpha D - \beta G(\lambda T) D^2),$$

где $G(\lambda T) = 2(\lambda T + e^{-\lambda T} - 1)/(\lambda T)^2$, λ – скорость восстановления, T – время доставки, D – доза. Был введен сдвиг в коэффициенте задержки дозы $G(\lambda T) \rightarrow G(\lambda T + \delta D)$, где δ – новый параметр, который рассчитывается путем корректировки областей низкой и высокой дозы с целью воспроизведения поведения LPL для бесконечных доз. Оптимальное значение для низких доз получается путем сопоставления третьих производных ($\lim_{D \rightarrow 0} d^3 \ln(S)/dD^3$) для обеих моделей, поскольку первая и вторая производные соответствуют α и β . Оптимальное значение для высоких доз рассчитывается путем уравнивания первой производной ($\lim_{D \rightarrow \infty} d \ln(S)/dD$) обеих моделей. Среднее значение между этими двумя значениями используется для лучшего воспроизведения поведения LPL. Возможная интерпретация параметра δ получается, если «эффективная скорость репарации» $\lambda_{eff} = \lambda + \delta D$. Таким образом,

MLQ эквивалентен модели LQ, если скорость восстановления линейно возрастает с мощностью дозы D. Модель LQ недооценивает срок восстановления второго порядка модели LPL и предсказывает большее уничтожение клеток при высоких дозах. Разница может быть компенсирована за счет увеличения скорости восстановления первого порядка в модели LQ по мере увеличения мощности дозы. При расчётах изоэффекта используются Fe-графики, с помощью которых строится обратная зависимость суммарной дозы изоэффекта D_{tot} от дозы за фракцию для различных режимов фракционирования. Если применяется модель LQ, ожидается мгновенное облучение: $1/D_{tot} = \alpha_1 + \alpha_2 d$, где d – доза на фракцию. Для модели MLQ $1/D_{tot} = \alpha_1 + \alpha_2 d G(\delta d)$, и кривые изоэффекта будут изогнуты с меньшим наклоном для больших разовых доз [54].

➤ **Универсальная модель кривой выживаемости (Universal Survival Curve - USC model).** В 2008 году С. Park et al. представили универсальную модель кривой выживаемости (Universal Survival Curve – USC model). USC модель интегрировала LQ с многоцелевой моделью, включающей эффекты как для низких, так и для высоких доз излучения на основе концепции «точки перегиба дозы», ниже которой облучение адаптируется к LQ модели, а выше – к модели USC. Это лучше отражает биологическую реальность радиационной летальности простых кривых выживаемости, но не учитывает многие различия в клинических ответах, связанных с SRS/SBRT. Важным аспектом модели является использование понятия асимптоты (от др.-греч. ἀσύμπτωτος – несовпадающая, не касающаяся кривой с бесконечной ветвью) – прямой, обладающей тем свойством, что расстояние от точки кривой до этой прямой стремится к нулю при удалении точки вдоль ветви в бесконечность. Для гиперболы $y=1/x$ асимптотами являются оси абсцисс и ординат. То есть асимптота – это прямая, к которой неограниченно близко приближается график функции при удалении его переменной точки в бесконечность. Кривая может приближаться к своей асимптоте, оставаясь с одной стороны от неё.

BED в этой модели определяется как общая доза, доставленная в бесконечном количестве в виде бесконечно малых фракций, которая имеет тот же биологический эффект, что и рассматриваемая схема фракционирования дозы. Графически BED определяется пересечением линии, касательной к кривой выживаемости модели LQ при $d=0$, с горизонтальной линией, представляющей биологический эффект,

равный эффекту дозы D . В случаях, когда общая доза D доставляется в n фракций величиной d числовое значение BED, выраженное в параметрах α и β модели LQ, может быть записано: $BED=D(1+d/(\alpha/\beta))$. BED, выраженная через параметры LQ модели, дает завышенную оценку фактической BED, определенной с помощью эмпирической кривой выживаемости. В модели строится новая кривая выживаемости, которая гибридизирует кривую модели LQ для диапазона низких доз и асимптоту многоцелевой (мультицелевой) модели для диапазона высоких доз, согласно формуле

$$\ln S = \begin{cases} -(\alpha \cdot d + \beta \cdot d^2) & \text{if } d \leq D_T \\ -\frac{1}{D_0} d + \frac{D_q}{D_0} & \text{if } d \geq D_T \end{cases}$$

Ниже переходной дозы D_T кривая USC идентична кривой модели LQ, а выше D_T кривая USC идентична конечной линейной части кривой многоцелевой модели. Модель USC может использоваться для получения изоэффектных отношений (функций эквивалентной дозы) любого произвольно фракционированного облучения, для общей дозы D , представленной в n фракциях, где каждая фракция с дозой d , каждый режим определяется пересечением кривой выживаемости отдельной фракции и горизонтальной линией изоэффекта, пересекающей кривую эффективной выживаемости при $D=dn$ [83].

Продемонстрировать, как LQ модель завышает эффективность дозы, можно на примере 2-х исследований (США и Япония), посвященных эффективности SBRT при раке лёгкого (таблица 5).

Таблица 5

Пример завышения эффективности дозы после SBRT по поводу рака лёгкого при использовании LQ модели и коррекция с использованием кривой USC [80, 83, 122]

Автор	Схема SBRT	BED ($\alpha/\beta=10$)	
		LQ	USC
Onishi H. et al. 2004 [80]	48 Гр / 4 фракции	106 Гр	80 Гр
Wulf J. et al., 2005 [122]	60 Гр / 3 фракции	180 Гр	107 Гр
Различия		в 1,7 раза	в 1,34 раза

При расчете с использованием классической LQ модели ($\alpha/\beta=10$), для схемы SBRT 60 Гр в трех фракциях получена $BED=180$ Гр, а для схемы 48 Гр в четырех фракциях $BED=106$ Гр (различия в

1,7 раза). Пересчет с использованием кривой USC позволил скорректировать эти цифры до 107 Гр и 80 Гр, соответственно, а различия в эффективности уменьшить с 1,7 до 1,34 раза [83].

➤ **Обобщенная линейно-квадратичная модель (Generalized LQ model - gLQ).** В 2010 году J.Z. Wang et al. предложили использовать **обобщенную LQ модель (gLQ)**, которая включает в себя весь диапазон доз, обоснованно утверждая, что классический LQ-вариант недопустимо переоценивает объем летальных повреждений клеток при использовании крупных фракций. В модели gLQ модели учитывается скорость возникновения сублетальных повреждений β_1 и в традиционную формулу включается параметр β_2 – соответствующий процессу восстановления сублетальных повреждений и вероятности превращения их превращения в летальные [29, 54, 83, 116].

$$\begin{cases} S = \exp(-\alpha D - \beta G D^2) \\ G = \frac{2}{D^2} \int_0^D I(w) dw \int_0^w I(v) dv \exp[-\mu(w-v) - \int_v^w \beta_2 I(s) ds] \end{cases}$$

Несмотря на важное значение модифицированных LQ моделей, следует признать существенные погрешности при их использовании. Ни традиционная LQ, ни одна из модифицированных (LPL, USC, gLQ) моделей не могут обеспечить точную оценку выживаемости клеток в диапазоне высоких доз, используемых при SRS/SABR/SBRT/HDR-БТ, поскольку они не учитывают сосудистые, иммунные и другие факторы, выходящие на первый план в этих условиях. Кривые выживаемости клеток, на которые влияют эти параметры, значимо отклоняются от прогноза модифицированных LQ моделей, что во многом связано с косвенными эффектами, например, радиационно-индуцированными повреждениями эндотелия сосудов и активацией иммунных процессов.

Для тестирования и улучшения модифицированных LQ моделей необходимо больше экспериментальных и клинических данных, и их следует с осторожностью использовать в клинической практике совместно с инструментами QUANTEC (Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic) и Emami's paper [1, 29, 41, 54, 83, 116].

Глава 6.

Роль сосудистых механизмов в реализации эффектов высокодозного облучения

Уже акцентировалось внимание на том, что опухолевый ответ на ионизирующее излучение реализуется посредством трех механизмов:

1) прямое цитотоксическое повреждение опухолевых клеток, вызванное поражением ДНК, которое происходит как при низких, так и при высоких дозах на фракцию;

2) непрямая гибель опухолевых клеток, которой предшествует повреждение сосудов и эндотелиальных клеток, преимущественно при высоких дозах за фракцию;

3) непрямая гибель опухолевых клеток за счет подключения иммунных механизмов.

Сосудистая сеть имеет важное значение в пролиферации и выживании опухолевых клеток, во многом определяя условия микросреды и общий ответ на лучевую терапию. Доля опухолевых клеток, подверженных прямой или не прямой смерти, зависит от разовой дозы, определяющей возможность повреждения сосудов.

При традиционной фракционированной лучевой терапии (ЛТ) роль сосудистой сети опухоли рассматривается как модулирующий фактор ответа опухоли на облучение посредством реоксигенации гипоксических клеток после каждой фракции. В ответе опухоли на фракционированную лучевую терапию низкими дозами преобладает гибель клеток в результате радиационно-индуцированного повреждения ДНК.

Первыми погибают радиочувствительные, насыщенные кислородом клетки. Последующая реперфузия и реоксигенация с каждой фракцией излучения переводит гипоксические и резистентные клетки в радиочувствительные.

Кровоток не изменяется, или незначительно увеличивается в начале курса, а затем снижается в его конце. Сосудистые эффекты высокодозного облучения выглядят иначе – преобладает непрямая гибель опухолевых клеток, возникающая главным образом в результате ишемии после летального повреждения эндотелиальных клеток и разрушения микрососудов, что обеспечивают немедленную тяжелую сосудистую реакцию.

Точные сосудистые механизмы, приводящие к косвенной гибели опухолевых клеток, до конца не изучены, обоснованно предполагают, что к ним относятся:

- 1) прямое повреждение эндотелиальных клеток микрососудов;
- 2) опосредованное воздействие через радиоиндуцированный «эффект свидетеля» (bystander effect; abscopal effect; коммунальный эффект) – немишенный эффект радиации, заключающийся в передаче радиационных сигналов от облученных клеток необлученным. Причем в реализации эффекта свидетеля принимают активное участие как сосудистые, так и иммунные механизмы, о чем будет отдельно подробно говориться ниже;
- 3) взаимодействие между радиорезистентными опухолевыми стволовыми клетками (self-renewing cancer stem cells - CSC) и микрососудистыми эндотелиальными клетками [107-110].

6.1. Характеристики сосудистой сети и кровотока опухоли

Стенка нормальных сосудов состоит из эндотелиальных клеток, окруженных базальной мембраной и перicyтами.

Различают 3 основных типа капилляров:

1) Капилляры с непрерывным эндотелием – наиболее распространенный тип. Диаметр их просвета менее 10 мкм. Эндотелиальные клетки связаны при помощи плотных контактов, содержат множество пиноцитозных пузырьков, участвующих в транспорте метаболитов между кровью и тканями. Капилляры этого типа характерны для мышц.

2) Капилляры с фенестрированным эндотелием – присутствуют в капиллярных клубочках почки, эндокринных железах, ворсинках кишки, в эндокринной части поджелудочной железы. Фенестра – тончайший участок эндотелиальной клетки диаметром 50-80 нм, облегчающий транспорт веществ через эндотелий.

3) Капилляры с прерывистым эндотелием (синусоидного типа, или синусоид) – типичны для кроветворных органов, состоят из эндотелиальных клеток с щелями между ними и прерывистой базальной мембраны [108].

В сравнении со строго иерархичной сетью нормальных тканей сосудистая сеть опухолей несовершенна, дефектна, структурно ано-

мальна, с извилистыми, расширенными, удлинненными и мешковидными участками. Сосуды опухолей негерметичны из-за неполноценной и хаотичной выстилки сосудов, на некоторых участках имеются сдавления 1) опухолевыми массами и 2) интерстициальным компонентом в связи с плохим лимфатическим дренажом. Ветвление новообразованных сосудов нерегулярно, с плохим трехмерным охватом объема опухоли и наличием значительных бессосудистых гипоксических и закисленных областей с высоким уровнем pH [96, 97, 108].

В 1971 году J. Folkman впервые предположил существование взаимозависимости между опухолевой паренхимой и эндотелиальными клетками сосудистой сети опухоли, назвав их «высоко интегрированной экосистемой» [44].

Ангиогенез – процесс, контролируемый и регулируемый доступностью кислорода. Изначально опухоль обычно возникает как бессосудистая масса, а кровоснабжение происходит посредством расположенных рядом сосудов. В последующем быстрое размножение опухолевых клеток приводит к всплеску метаболической активности, увеличивая потребность в кислороде, приводя к возникновению локальных областей гипоксии и высвобождению диффузных ангиогенных факторов, экспрессия которых регулируется индуцированными гипоксией факторами транскрипции (hypoxia-inducible factors – HIF). HIF-регулируемые проангиогенные факторы увеличивают проницаемость сосудов, пролиферацию эндотелиальных клеток, рост, миграцию, адгезию и образование трубок [67].

Рост новых сосудов из ранее существовавших в процессе ангиогенеза происходит в результате реализации нескольких механизмов:

1) путем активации эндотелиальных клеток основными факторами роста фибробластов (basic fibroblast growth factors – bFGF) и факторами роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factors – VEGF);

2) посредством пролиферации и инвазии эндотелиальных клеток в окружающий матрикс в результате деградации внеклеточного матрикса и базальной мембраны предсуществующих сосудов;

3) инвагинацией ангиогенеза – разделением кровеносного сосуда на два новых за счет образования трансвакулярных тканевых столбов;

4) путем привлечения и дифференцировки *in situ* эндотелиальных клеток-предшественников;

5) васкулогенной мимикрией – образованием новых кровеносных сосудов самими опухолевыми клетками – особенно при агрессивных новообразованиях [58, 127, 108].

Сейчас очевидно, что сосудистая сеть оказывает прямое влияние на микроокружение опухоли, её оксигенацию, кислотность, пролиферативный потенциал. Известно, что уровень оксигенации – одно из определяющих условий радиочувствительности, а реакция гипоксических тканей на лучевую терапию слабая. Наличие молекулярного кислорода (O_2) необходимо для реализации цитотоксических эффектов излучения, опосредованных образованием активных форм кислорода (reactive oxygen species – ROS) [108].

Исследования, проведенные во Франции в 1920-30-х годах Regaud, Ferroux и Coutard, продемонстрировали, что при фракционировании ЛТ происходит увеличение терапевтического соотношения, связанное с реоксигенацией гипоксических тканей по мере гибели клеток в перфузированных областях опухоли. Впервые в 1936 г. J.C. Mottram заметил, что хорошо кровоснабжаемые наружные отделы опухолей более радиочувствительны, чем гипоксический центр [76]. Долгое время сосудистые эффекты излучения рассматривались через призму фракционированной ЛТ как косвенного модулятора радиосенсибилизации.

Однако в 2003 г. M. Garcia-Bargos продемонстрировал, что картина радиационно-индуцированных эффектов более сложна и во многом определяется повреждением микрососудов, а основной мишенью ЛТ могут быть не опухолевые клетки, а эндотелиальные клетки сосудов [49, 50].

Механизмы опухолевого ответа на ЛТ во многом связаны с сосудистыми эффектами – повреждением сосудов и сосудистым коллапсом. Эндотелиальные клетки сосудов опухоли гораздо более радиочувствительны, чем клетки сосудистой сети нормальных тканей, и их гибель приводит к разрушению стенки сосуда. Нарушение проницаемости и экстравазация плазмы увеличивает концентрацию эритроцитов в капиллярах, замедляет перфузию крови, повышает давление интерстициальной жидкости в опухоли и вызывает сосудистый коллапс.

Взаимодействие между опухолевыми микрососудистыми эндотелиальными клетками и опухолевыми паренхиматозными клетками является сложным и дозозависимым.

1 эндотелиальная клетка ($\approx 80 \mu\text{m}$) отвечает за кровоснабжение сегмента из ≈ 2000 клеток (толщиной $\approx 100 \mu\text{m}$). Соответственно, нарушение проходимости даже небольшого отрезка капилляра, соответствующего одной эндотелиальной клетке, приводит к лавинообразному повреждению опухолевых клеток (рис. 3) [84].

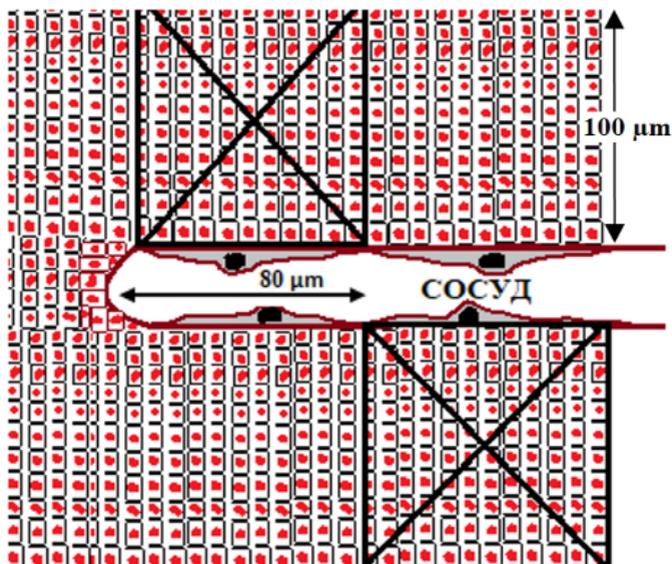


Рис. 3. Непрямая лавинообразная гибель опухолевых клеток при лучевом эндотелиальном повреждении.

6.2. Характеристики воздействия ЛТ на сосудистую сеть и кровоток опухоли

Рассмотрим варианты воздействия лучевой терапии на сосудистую сеть и кровоток опухоли.

6.2.1. Фракционированная лучевая терапия

Фракционированная лучевая терапия в низких разовых дозах (1,8-3 Гр) инициирует активацию клеточных сигнальных путей, которые приводят к апоптотической гибели эндотелиальных клеток. Гибель опухолевых клеток зависит от наличия активных форм кислорода, доступных после каждого цикла гипоксии, реперфузии и

ионизации. Генерация окислительного стресса в результате повторяющихся циклов гипоксии и реоксигенации вызывает высвобождение индуцируемого гипоксией фактора 1 (hypoxia-inducible factor 1 – HIF-1), фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor – VEGF) и основного фактора роста фибробластов (basic fibroblast growth factor – bFGF). Эти факторы способствуют выживанию эндотелиальных клеток и оказывают значительное гасящее влияние на сигналы гибели клеток.

6.2.2. Высокодозная лучевая терапия

В ответ на высокие разовые дозы облучения (>8-10 Гр) ASMase (Acid sphingomyelinase) эндотелиальных клеток транслоцируется во внешний отдел клеточной мембраны, где гидролизует сфингомиелин (sphingomyelin – SM) с образованием церамида. *Церамиды* – подкласс липидных молекул, самый простой тип сфинголипидов – состоят из сфингозина и жирной кислоты и являются важным липидным компонентом клеточной мембраны и синтеза сфингомиелина, а также сигнальной молекулой, участвующей в клеточной дифференцировке, пролиферации и апоптозе. Церамид активирует апоптотический каскад.

Проангиогенные факторы, такие как сфингозин-1-фосфат (sphingosine-1-phosphate – S1P), VEGF и bFGF, проявляют защитный антиапоптотический эффект, если присутствуют в достаточных количествах. Гибель опухолевых клеток в этом процессе – вторичный эффект повреждения сосудов. Подобный подход контрастирует с классической теорией индуцированной ионизирующим излучением гибели клеток, происходящей по опосредованному p53 пути в результате повреждения клеточной ДНК.

Эндотелиальные клетки особенно уязвимы к радиационно-индуцированному апоптозу через путь ASMase, поскольку у них в 20 раз выше уровень секреторной ASMase по сравнению с другими типами клеток. Механизм апоптоза эндотелиальных клеток был детально исследован и описан Z. Fuks и R. Kolesnick (2005). Окно доз облучения, при которых происходит опосредованная церамидом гибель эндотелиальных клеток, начинается с 8-10 Гр при однократном воздействии и достигает максимума при 20-25 Гр [47, 108].

6.2.3. Клиническое и экспериментальное обоснование

Число опубликованных экспериментальных работ, посвященных изучению на людях сосудистых эффектов высоких доз радиации ограничено, однако существует ряд исследований на животных, которые могут дать представление об этих феноменах.

В 1970-х годах проведена большая экспериментальная работа с исследованием сосудистых эффектов в опухолях рака молочной железы крыс Walker 256, облученных дозами от 2,5 Гр до 60 Гр. Это исследование было первой демонстрацией того, что кровеносные сосуды опухоли обладают более высокой проницаемостью по сравнению с нормальной тканью. Проницаемость сосудов оценивали путем измерения экстравазации белков плазмы (альбумина, меченного йодом-125). Было показано, что увеличение проницаемости сосудов достигало пика через 24 часа после облучения в дозах от 2 до 20 Гр. Во всех случаях повышение проницаемости сосудов было преходящим, возвращаясь к уровню, предшествовавшему облучению, в течение нескольких дней.

Наблюдалось дозозависимое уменьшение объема сосудов: на 6-12 часов при дозах 2,5 Гр и ниже; на несколько дней (обычно 2-6) при 5-10 Гр и длительно при более высоких дозах. Существенное повреждение сосудов и уменьшение их объема при облучении дозами выше 10 Гр было статистически значимым ($p < 0,001$). Сосудистая проницаемость в опухолях была в 20-30 раз выше, чем в мышцах. Изменения зависели от дозы и количества фракций – доза 20 Гр в 1 фракции вызывала более существенный эффект, чем та же доза, введенная в четырех или восьми фракциях. При облучении 20 Гр в 8 фракциях ($8 \times 2,5$ Гр), объем сосудов сначала немного увеличивался, а затем уменьшался.

При облучении 30 Гр в одной фракции функциональный внутрисосудистый объем (functional intravascular volume) быстро снижался и оставался таким 15-16 дней, опухолевый рост при этом продолжался ещё 7-8 дней, а затем начинался регресс. После восстановления сосудистого объема большинство регрессировавших опухолей (80%) продолжили рост [96, 97, 108].

M. García-Barros et al. (2003, 2010) продемонстрировали, что апоптоз эндотелиальных клеток регулирует реакцию опухолевых клеток на радиацию. Так, ксенотрансплантаты опухолей фибросаркомы (MCA/129) и меланомы (B16F1) были устойчивы к однократ-

ному воздействию фракцией в 15 Гр при выращивании у мышей с дефицитом *ASPMase*, в то же время обеспечивая 50% контроль опухоли у мышей дикого типа. Первоначальный быстрый апоптоз эндотелия сосудов происходил, начиная с 1 часа и достигая максимума через 4-6 часов после облучения. Гибель опухолевых клеток в этом окне была минимальной, но значительно возрастала через несколько дней [49,50,108].

В публикации Y. Yamada et al. (2008), показано, что при однократном облучении в диапазоне 18-24 Гр в 80-90% достигается контроль опухоли [124]. J.M. Brown et al. (2010) провели математические расчеты ожидаемого уровня гибели клеток, используя стандартную LQ модель и предполагая, что в опухоли имеется 20% гипоксических клеток. Было установлено, что полученные результаты не могли быть объяснены только прямой гибелью опухолевых клеток без ее значительной коррекции за счет введения сосудистых эффектов. Аналогичные выводы сделали и M. Kocher et al. (2000) при использовании моделирования методом Монте-Карло для сопоставления данных о клиническом ответе на однократное облучение (n=90; средняя доза 20 Гр) [18-21, 66].

Гипотетическая иллюстрация дозозависимости механизмов гибели клеток в опухолях была представлена в публикации C.W. Song et al. (2012) [96, 97]. Авторы предположили, что 10% клоногенных клеток являются гипоксическими, прямая гибель опухолевых оксигенированных клеток доминирует в диапазоне 0-5 Гр, прямая гибель опухолевых гипоксических клеток доминирует в диапазоне 5-12 Гр, а непрямая гибель опухолевых и тех и других клеток из-за повреждения сосудов преобладает в дозах, превышающих 10-12 Гр. При этом уровень прямой и косвенной гибели клеток при SRS и SBRT зависит от размера фракции, а не от общей дозы [96, 97].

В публикации H.J. Park et al. (2012), обобщившей 43 репрезентативных исследования радиационно-индуцированных изменений сосудистой сети опухоли за последние 60 лет, показано, что облучение дозами выше 10 Гр в одной фракции или 20-60 Гр в ограниченном количестве фракций вызывает серьезное повреждение сосудов, изменения микроокружения и гибель опухолевых клеток. Так, в опухолях, получающих однократные, умеренно высокие дозы облучения (5-10 Гр), первоначальное увеличение кровотока сопровождается возвращением к исходному, или более низкому уровню в течение нескольких дней.

При более высоких разовых дозах (10-15 Гр) немедленное снижение кровотока сохраняется в течение нескольких дней, обычно возвращаясь к контрольному уровню. Наконец, при очень высоких разовых дозах (15-20 Гр) кровотока в опухоли быстро уменьшается, сопровождается необратимым повреждением сосудов и гибелью опухолевых клеток [84, 108].

В исследовании К.А. Kumar et al. (2017) представлены данные пилотного исследования (n=30) в отношении пациентов с метастазами в позвоночник, получившими однофракционную SRS (24 Гр), либо SBRT (3-5 фракций, СОД 27-30 Гр). При выполнении динамической магнитно-резонансной томографии с контрастным усилением (DCE-MPT) до и после ЛТ для оценки уровня перфузии показано, что показатель объема плазмы (plasma volume – Vp), связанный с васкуляризацией опухоли, был значительно ниже у пациентов с локальным контролем (LC) в течение 20 месяцев наблюдения. Средний показатель Vp для пациентов без местного рецидива по сравнению с пациентами с местным рецидивом составил -76% и + 28%, соответственно (p<0,01).

Чувствительность и специфичность прогностического значения Vp для LC составили 100% и 98%. Изменения уровня Vp позволяло предсказать местный рецидив в среднем на >6 месяцев раньше, чем при стандартной визуализации [68, 108].

6.2.4. Клинические попытки модификации сосудистого ответа на облучение при комбинированном лечении

Медикаментозное усиление сосудистого ответа на ЛТ потенциально может способствовать снижению дозы и токсичности при значительном улучшении результатов. Один из подходов к повышению эффективности облучения воздействием на сосудистые механизмы заключается в попытках одновременного угнетения ангиогенеза. Так, Е.А. Kleibeuker et al. (2012) в своей публикации описали явление сосудистой нормализации – ремоделирования дисфункциональной опухолевой сосудистой сети, заключающееся в увеличении количества перицитов, оптимизации базальной мембраны и уменьшении дилатации сосудов в ходе проведения ангиостатической терапии.

Однако угнетение ангиогенеза вызывает снижение плотности сосудов и уменьшение перфузии, соответственно, приводит к гипо-

ксии опухоли и повышению радиорезистентности. Для переходного периода нормализации сосудов, улучшения перфузии и оксигенации опухоли в период антиангиогенной терапии предложен термин «окно нормализации», которое вместе с индуцированной облучением передачей сигналов проангиогенеза обеспечивает рациональное сочетание антиангиогенной и лучевой терапии.

В публикации J.P. Trzeman et al. (2010) продемонстрировано, что локальный уровень керамидов во внешней оболочке плазматической мембраны определяет, находятся ли эндотелиальные клетки в антиапоптотическом (проангиогенном) или проапоптотическом (антиангиогенном) состоянии. Соответственно существует возможность использовать антиангиогенную терапию для усиления керамидной сигнализации.

Восстановление уровня керамида в клетках, где путь ASMAse ранее был ингибирован VEGF/bFGF, вновь способно запустить апоптоз, даже в продолжающемся их присутствии. Мощное, но быстро проходящее ингибирование рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) может быть достаточным, чтобы вызвать синергию с SBRT, что указывает на важность сроков доставки антиангиогенных препаратов – непосредственно перед облучением [108].

G.J. Czarnota et al. (2015) предложили методику биофизического индуцирования сосудистого ответа на облучение с использованием акустической стимуляции микропузырьков для механического повреждения плазматической мембраны эндотелиальных клеток [55].

Растворы микропузырьков представляют контрастные для ультразвука газовые сферы, стабилизированные биосовместимой липидной или белковой оболочкой, диаметром 3-4 микрона, что позволяет им свободно циркулировать в микроциркуляторном русле при внутривенном введении. В ультразвуковом поле на резонансной частоте в них возникают колебания и кавитация с повреждением мембран близлежащих клеток эндотелия и усилением эффектов облучения. В экспериментах с ксенотрансплантатами опухолей мочевого пузыря, молочной железы и предстательной железы в одной группе мышам вводили микропузырьки, стимулированные ультразвуком (ultrasound-stimulated microbubbles – USMB), с последующей однократной дозой ЛТ 2-8 Гр, в другой группе проводили только облучение.

В течение 24 часов после лечения в группе USMB зафиксирована гибель значительной части опухолевых клеток (40-70%), а в аль-

тернативной группе их доля составила 4 ± 2 . Иммуногистохимическое исследование образцов опухоли показало, что основной мишенью при использовании методики были эндотелиальные клетки. Их повреждение приводило к нарушению проницаемости (окраска фактором VIII) и сосудистому коллапсу (окраска CD-31).

Допплеровское исследование также показало снижение сосудистого индекса в группе USMB на 65% против 20% в альтернативной. Мыши, получавшие дозу 24 Гр ($BED_{10}=28,8$) в сочетании с USMB, показали лучшую выживаемость, чем мыши, получавшие гораздо более высокую дозу только ЛТ ($BED_{10}=58,5$). Метод обладает потенциалом преобразования низких доз в лечебные [55].

Глава 7. Иммунные механизмы в радиобиологии высокодозного облучения

Иммунный ответ после высокодозного облучения (SRS/SBRT/SABR) во многом определяет локальный контроль (Local Control – LC) опухоли.

Многочисленные предклинические и клинические исследования показали, что неповрежденная иммунная система, включая цитотоксические Т-клетки и антигенпрезентирующие дендритные клетки, необходима не только для иммунного надзора, но и для эффективного контроля опухоли.

Неоднократно продемонстрировано, что у пациентов с хронической иммуносупрессией непосредственные и отдаленные результаты лечения хуже, чем у иммунокомпетентных.

Высокодозное облучение способствует высвобождению опухолевых антигенов и молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением (damage-associated molecular pattern – DAMP), что является первым шагом каскада активации антиген-презентирующих дендритных клеток (dendritic cells – DCs).

DC поглощают, обрабатывают и перекрестно представляют опухолевые антигены с помощью главного комплекса гистосовместимости I класса (major histocompatibility complex – MHC) для активации CD8+ цитотоксических Т-клеток (cytotoxic T-cells – CTL), которые отвечают за уничтожение выживших после облучения клоногенов. SRS/SBRT/SABR могут генерировать эффекты аутоиммунизации, как бы создавая противоопухолевую аутологичную вакцину *in situ*, индуцируя противоопухолевый иммунитет, участвующий в формировании LC [31, 32, 108].

Облучение может приводить к увеличению инфильтрации опухоли лимфоцитами с помощью двух основных механизмов:

- 1) увеличение проницаемости сосудистой сети опухоли и повышение экспрессии молекул эндотелиальной адгезии, что приводит к усилению экстравазации иммунных клеток;
- 2) высвобождение хемокинов для стимуляции миграции и инвазии иммунных клеток.

7.1. Иммунные эффекты при проведении лучевой и химиолучевой терапии

Рассмотрим наиболее часто обсуждаемые иммунные эффекты при проведении лучевой и химиолучевой терапии:

- прямая и косвенная активация воспалительных цитокинов, например, IL-1 и TNF, что рекрутирует иммунные клетки, и приводит к интенсивной инфильтрации опухоли CD8 (+) Т-клетками и потере миелоидных супрессорных клеток;

- радиотерапия запускает путь иммуногенной гибели клетки, что приводит к транслокации цитозольного белка – шаперона (CRT) на клеточную поверхность (сигнал «eat me»), а также к высвобождению белка группы 1 с высокой подвижностью HMBG-1 и молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением (DAMPs), которые способствуют инициации провоспалительных явлений. Вышеуказанные события приводят к активации дендритных клеток и запуску цитотоксических реакций;

- шапероны (chaperones – компаньоны, сопровождающие) – класс белков, главная функция которых состоит в восстановлении правильной нативной третичной или четвертичной структуры белков, а также образование и диссоциация белковых комплексов. Термин предложен Роном Ласки (R.A. Laskey, 1973) при описании ядерного белка нуклеоплазмينا, способного предотвращать агрегирование белков-гистонов с ДНК при образовании нуклеосом. Механизм действия шаперонов – нековалентное присоединение к белкам и их «расплетение» с использованием энергии гидролиза АТФ. Многие из них являются белками теплового шока (отсюда аббревиатура – heat shock proteins – HSP), то есть белками, экспрессирующимися при температурном или других клеточных стрессах. Они несут важные регенеративные функции и участвуют в транспортировке веществ через мембраны (например, в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме). Шапероны классифицируют в соответствии с их молекулярной массой: HSP104, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 и малые шапероны (sHSP);

- высвобождение интерферонов типа I и типа II, индуцированное ионизирующим излучением, также играет роль в активации дендритных клеток. Активированные DC мигрируют в лимфатические узлы, чтобы представить антиген Т-клеткам и приводить к специфической для опухоли активации и пролиферации Т-лимфоцитов.

Зрелые и активированные внутриопухолевые DC могут секретировать хемокины, которые рекрутируют эффекторные CD8+ Т-клетки в опухоль;

- разрушение опухолевых клеток и высвобождение их антигенов с гибелью иммуногенных клеток вызывает «водопад» высвобождения антигенов некроза опухоли и АТФазы;
- радиотерапия вызывает повышенную экспрессию на клеточной поверхности молекул МНС класса I. Эти эндогенные пептиды содействуют распознаванию опухолевых клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами. При облучении ложа опухоли повышается экспрессия провоспалительных хемокинов, таких как CXCL16 и эндотелиальных факторов адгезии VCAM и ICAM-1, которые направляют иммунные клетки в опухолевые очаги;
- на основе иммунных механизмов разрабатывается комбинация лучевой терапии с иммунотерапией;
- обсуждается возможность использовать прогностический и предиктивный потенциал «абскопального эффекта» [108, 110].

7.2. Основные феномены модификации иммунного ответа на облучение

Основными феноменами модификации иммунного ответа на облучение являются [31, 32]:

1. Усиленная облучением презентация антигенов (radiation-enhanced antigen presentation – REAP).
2. Индуцированные облучением DAMP сигналы, ассоциированные с клеточным повреждением (Radiation-Induced DAMP Signals).
3. Индуцированная облучением вирусная мимикрия (Radiation-Induced Viral Mimicry).
4. Иммуносупрессивные эффекты лучевой терапии (Immunosuppressive Properties of RT).
5. Уход опухоли от иммунного ответа и радиорезистентность (Immune Evasion by Tumors and Radioresistance).
6. Облучение, как иммуномодулирующее средство, характер которого определяется дозой и фракционированием (Radiation as an Immunomodulatory Drug: Effect of Dose and Fractionation of RT):
 - а) иммуноаблятивное облучение – высокие дозы (Immunoblative RT – IART).

b) иммуномодулирующее облучение – средневысокие дозы (Immunomodulatory RT – IMRT).

с) облучение, модулирующее микроокружение опухоли (tumor microenvironment – TME) – низкие дозы, классическое фракционирование (Tumor Microenvironment Modulating RT - TMEM-RT)

Далее будет дана характеристика каждому из этих феноменов.

7.2.1. Усиленная облучением презентация антигенов (radiation-enhanced antigen presentation – REAP)

Этот феномен стал неотъемлемым компонентом стратегии вакцинации против солидных опухолей. Для опухолевых клеток характерны уникальные антигены, которые включают вирусные белки, мутированные онкопротеины (такие как p53 и ras), гибридные белки, экспрессируемые из транслоцированных онкогенов (таких как BCR-ABL), эмбриональные белки, не экспрессируемые нормальными взрослыми тканями. Некоторые из этих «онкофетальных» белков служат эпитопами (антигенными детерминантами, распознаваемыми иммунной системой) для гуморального и клеточного иммунного ответа хозяина. Иммунная система обладает потенциалом распознавать и уничтожать предопухолевые клетки с мутировавшими белками.

В процессе эволюции опухолей мутировавшие клетки лишаются экспрессии белков, участвующих в обработке и презентации антигенов, таких как продукт гена-переносчика антигена, TAP-2 (Transporters associated with Antigen Processing) и молекул МНС I класса. Это адаптивное уклонение от иммунного надзора включает отбор менее иммуногенных клонов опухолевых клеток и часто опосредуется приобретением мутаций с потерей функции и эпигенетической регуляцией транскрипции генов, которые участвуют в иммунном распознавании и эффекторных путях адаптивного иммунитета к опухоли.

Хотя вакцинация определенными опухолевыми антигенами и пептидами имеет очевидную привлекательность, естественная иммуновариантность, полиморфизм МНС и антигенные потери потребовали бы использования постоянно меняющегося состава потенциальных опухолевых антигенов в вакцинах [31, 32, 110].

В ряде публикаций, например, в работе S. Demaria et al. (2015) показано, что вместо создания индивидуальных вакцин может быть разработан радиационно-опосредованный, аутологичный подход к

вакцинации *in situ*, при котором циркулирующие антиген-презентирующие клетки (antigen presenting cells – APCs), такие как DC стимулируются к проникновению в облученные опухоли для сбора антигенного материала, высвобождаемого из апоптотических и некротических клеток. В нормальной периферической крови циркулирующие DC являются редкими (<1%), но их количество можно увеличить введением fms-подобного лиганда тирозинкиназы 3 (fms-like tyrosine kinase 3 ligand – Flt3L), который является естественным гликопротеином, цитокином, стимулирующим пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических и дендритных клеток (DC) в синергии с другими колониестимулирующими факторами и интерлейкинами.

Было доказано в эксперименте, что после локального облучения опухоли системное введение Flt3L индуцирует пролиферацию и инфильтрацию облученных опухолей наивными циркулирующими DC, включая Batf3-зависимые CD131+ и CD141+ DC, которые способны поглощать погибающие облученные опухолевые клетки для презентации антигена Т-клеткам в дренирующих лимфатических узлах. Это приводит к пролиферации цитотоксических Т-клеток, которые циркулируют в крови, уничтожая дистантные необлученные опухолевые клетки (потенциальные отдаленные метастазы) [31, 32].

При облучении стимулируется трансляция новых белков за счет активации мишени рапамицина млекопитающих (target of rapamycin – TOR; mammalian target of rapamycin – mTOR; FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 – FRAP1) – протеинкиназы серинтреониновой специфичности, которая в клетке существует как субъединица внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов TORC1 и TORC2.

В составе этих комплексов TOR регулирует клеточный рост и выживание. Комплекс TORC1 является мишенью иммунодепрессанта рапамицина (это объясняет название белка «мишень рапамицина»). TOR1 и TOR2 играют центральную роль в контроле клеточного роста. Нарушение TOR1 почти не оказывает влияния на клетки, а нарушение TOR2 приводит к организации актинового цитоскелета, синтезу сфинголипидов, к эндоцитозу и к остановке клеточного цикла на G2/M фазе. Нарушение же обоих белков приводит к остановке клеточного цикла на фазе G0. Таким образом, TOR2 имеет две области функционирования: одна – самостоятельная, другая – совместная

с TOR1, но оба пути приводят к контролю клеточного цикла на разных фазах [110].

Также облучение увеличивает экспрессию на поверхности клеток молекул МНС класса I и рецепторов клеточной смерти, таких как Fas, в зависимости от дозы, тем самым увеличивая выработку пептидов, презентацию антигена и восприимчивость к цитотоксичности, опосредованной Т-клетками. Fas-рецептор (FasR; апоптозный антиген 1 – APO-1 или APT; кластер дифференцировки 95 – CD95; член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 6 – TNFRSF6) – белок, который у людей кодируется геном FAS и представляет собой рецептор смерти (апоптоза). Активация FasR является началом одного из двух путей апоптоза – рецептор-опосредованного (он является внешним), второй путь – митохондриальный (внутренний).

Облучение индуцирует транскрипцию и вариантный сплайсинг (сращивание) транскриптов эндогенного ретровируса К человека (Human endogenous retrovirus K – HERV-K) в клетках рака предстательной и молочной желез человека, тем самым повышая вероятность того, что aberrантные пептиды HERV-K также могут способствовать повышению иммуногенности после ЛТ. Фактически HERV-K запускает Т-клеточный ответ у больных раком молочной железы. Были даже разработаны химерные Т-клетки, экспрессирующие рецепторы антигена, нацеленные на пептиды HERV-K, которые могут ингибировать рост опухоли и метастазы. Другим источником неоантигенов в облученных опухолевых клетках могут быть пептиды, кодируемые альтернативными или неизвестными трансляционными механизмами.

Важность скрытой трансляции (cryptic translation) для иммунного надзора становится все более очевидной благодаря независимым открытиям CD8⁺ Т-клеток, активированных пептидами, кодируемыми в альтернативных трансляционных рамках считывания в опухолях, вирусных мРНК и В-клетках человека. Поскольку эти «загадочные» (cryptic) антигены отсутствуют в тимусе, CD8⁺ Т-клетки к ним не толерантны и мощно реагируют. Учитывая иммуногенность криптопептидов для выявления ответов CD8⁺ Т-клеток, они обеспечивают уникальные потенциальные мишени для вакцин и иммунотерапии. Следовательно, возможно, что повышенная иммуногенность облученных клеток обусловлена экспрессией неоантигенов.

7.2.2. Индуцированные облучением DAMP (damage-associated molecular pattern – DAMP) сигналы, ассоциированные с клеточным повреждением (Radiation-Induced DAMP Signals)

Врожденная иммунная система поддерживает гомеостаз организма, распознавая чужеродные патогены и проявления клеточного стресса посредством связывания лигандов, ассоциированных с патогеном (pathogen-associated molecular pattern – PAMP) и лигандов, ассоциированных с повреждением (damage-associated molecular pattern – DAMP).

Их опознание происходит через рецепторы распознавания образов (pattern recognition receptors – PRR), таких как toll-подобные рецепторы (toll-like receptors – TLR), рецепторы, подобные гену, индуцируемому ретиноевой кислотой (retinoic acid-inducible gene – RIG-1-like receptors – RLR), AIM2-подобные рецепторы (AIM2-absent in melanoma 2-like receptors – ALR) и NOD-подобные рецепторы NLR (домен олигомеризации, связывающий нуклеотиды – nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors – NLR) [110].

Наиболее распространенными являются паттернраспознающие толл-(toll)-подобные рецепторы (TLR) – семейство молекул, состоящее из 10 трансмембранных одноцепочечных белков-рецепторов со сходным строением и молекулярной массой 90-115 кДа. Они имеют внеклеточную, трансмембранную и внутриклеточную части. Внеклеточная часть TLR, богатая лейцином, связывается с лигандами (компонентами клетки) микроорганизмов.

Внутриклеточная часть TLR, отвечает за взаимодействие с адаптерными молекулами внутриклеточных сигнальных путей, что приводит к индукции синтеза провоспалительных генов и экспрессии интерферонов 1 типа, а также апоптоза. На клеточном уровне толл-рецепторы широко экспрессированы на структурных клетках (эпителиальные, фибробласты, эндотелиальные клетки); иммунных клетках – моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, дендритных клетках, естественных киллерах; в меньшей степени на эозинофилах, лимфоцитах [51, 69, 110].

DAMP – молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждением – это молекулы, инициирующие неинфекционный воспалительный ответ. Белки DAMP находятся в клеточном ядре и внутриклеточной жидкости, их перемещение на поверхность клетки, или в

межклеточное пространство (из восстановленной среды к окисленной) приводит к денатурации. После некроза клеток опухолевая ДНК также высвобождается и превращается в DAMP. То есть DAMP-молекулы возникают в процессе повреждения клеток и клеточного стресса, особенно при иммуногенной гибели клеток (immunogenic cell death – ICD). Причем облучение индуцирует ICD и экспрессию сигналов DAMP дозозависимым образом.

PAMP – pathogen-associated molecular pattern – молекулярные фрагменты, ассоциированные с патогенами, в отличие от DAMP отвечают за возникновение ответа на инфекционный возбудитель. DAMP- и PAMP-молекулярные фрагменты способны подавать сигналы для активации дендритных клеток.

В процессе иммунного ответа на гибель опухолевых клеток рекрутируются иммунные эффекторские клетки в TME либо с индукцией толерантности к Т-клеткам, либо с активацией противоопухолевого иммунитета.

Дендритные клетки получают 2 типа сигналов:

1) «съешь меня – eat me», представленный транслокацией цитоплазматического калретикулина (calreticulin) на клеточную мембрану для поглощения погибших клеток;

2) сигнал «опасность – danger», который активирует обработку и презентацию антигена Т-клеткам.

Клетки, подвергающиеся ICD, высвобождают ядерный белок, белок 1-й группы высокой подвижности (high mobility group box 1 protein – HMGB1), которые связываются с Toll-рецептором 4 (TLR 4) в DC, обеспечивая сигнал «опасности» для TLR4-зависимой презентации антигена и активации Т-клеток. Под эндогенными и экзогенными сигналами опасности в настоящее время понимаются те, которые побуждают иммунную систему реагировать на различные агенты, причиняющие вред организму, а не просто являются чужеродными. DC, как стражи иммунной системы, реагируют именно на такие образцы антигенов, созревают и активируются с индукцией костимулирующих молекул Т-клеток, таких как CD80 и CD86.

Помимо HMGB1 эндогенные сигналы «опасности» предоставляются АТФ, окисленными липидами, формилированными пептидами, мочевой кислотой, белками стресса, теплового шока (heat shock proteins – HSP). Белки теплового шока активно воспринимаются DC для перекрестной презентации через рецепторы HSP (CD91 для gp96, калретикулин, HSP70 и HSP90; CD14 для HSP70). CD8+ Т-клетки

толерантны к «собственным» антигенам из нормальных тканей и реагируют только на мутировавшие пептиды опухолевых клеток [31, 32, 51, 69, 110].

7.2.3. Индуцированная облучением вирусная мимикрия (Radiation-Induced Viral Mimicry)

Двухцепочные разрывы ДНК (Double-Stranded DNA – dsDNA) являются одной из причин гибели облученных опухолевых клеток, а за их последующее удаление отвечает врожденный и адаптивный иммунитет. Радиационно-индуцированный генотоксический стресс (genotoxic stress) приводит к накоплению dsDNA, состоящей из митохондриальной ДНК (mtDNA) и геномной ДНК (gDNA), а также РНК в цитозоле опухолевых клеток, имитируя вирусную инфекцию. Облучение может индуцировать экспрессию эпигенетически «заглушенных» вирусных генов в опухоли и индуцировать иммунный ответ.

При поглощении облученных опухолевых клеток, инфильтрирующими опухоль DC цитозольный сенсор ДНК, циклическая GMP-AMP (cGAMP – Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate) синтетаза (cGAS), связывается с dsDNA и продуцирует cGAMP, который активирует стимулятор генов интерферона (stimulator of interferon genes – STING), белок, связанный с эндоплазматическим ретикуломом (endoplasmic reticulum – ER). Затем STING активирует TANK-связывающую киназу 1 (TANK-binding kinase 1 – TBK1) и ингибитор ядерного фактора – каппа В (каппа В – NF-κB) киназу эпсилон (epsilon – IKKe), которая, в свою очередь, фосфорилирует регуляторный фактор интерферона 3 (IRF3), вызывая его транслокацию в ядро для индуцирования транскрипции генов интерферона I типа (IFN).

Внеклеточная собственная геномная и митохондриальная ДНК, высвобождаемая умирающими клетками, связывается с антимикробным пептидом LL37 и эндоцитозуется в эндосомальные отделы плазмацитоидных дендритных клеток, приводя к активации TLR-9 и индукции IFN I типа. Связывание LL37 придает устойчивость к разрушению ДНКазой II (DNase) молекул dsDNA, предотвращая аутофагическое распознавание и позволяя активировать сенсоры ДНК в DC. Окисленная dsDNA является мощным стимулятором воспали-

тельных цитокинов, устойчивым к разрушению экзонуклеазами первичной репарации 1 (three prime repair exonuclease 1 – TREX1). Недавние сообщения показывают, что TREX1 индуцировался в опухолевых клетках после воздействия высоких доз за фракцию (>12-18 Гр).

Кроме DC, проникающих в опухоль, облученные опухолевые клетки сами могут экспрессировать гены IFN типа I. После облучения восстановление dsDNA в основном происходит во время остановки клеточного цикла. Ингибирование прогрессирования клеточного цикла через митоз или подавление пути cGAS-STING отменяет воспалительную реакцию и регрессию необлученных абскопальных опухолей. Реакция на повреждение ДНК включает быстрый подбор ферментов репарации ДНК и семейства киназ, связанных с фосфатидилинозитол-3-киназой (phosphatidylinositol 3 kinase – PI3K), ATM, ATR (ataxia-telangiectasia mutated Rad3 related) и ДНК-зависимой протеинкиназой (DNA-dependent protein kinase – DNA-ПК), которая действует как преобразователи сигналов разрывов dsDNA и регулирует контрольные точки клеточного цикла и выживание клеток.

Активация киназы, связанной с PI3K, приводит к активации Chk1 и Chk2, за которыми следует активация NF-κB, приводящая к остановке клеточного цикла и апоптозу или передаче сигналов через IRFs, главным образом IRF7, и активацию гена-стимулятора интерферона (ISG) с высвобождением IFNα и IFNλ. ATM действует как основной преобразователь передачи сигналов IFN, а также играет роль в регуляции NKG2DL клеточной поверхности, повышая восприимчивость поврежденных ДНК клеток к уничтожению естественными клетками-киллерами (natural killer cell – NK).

Наряду с ДНК цитозольная РНК, обнаруживаемая рецепторами PRRs и TLR, также является индуктором ISG, как правило, в ответ на вирусную инфекцию. Два фермента РНК-геликазы выявляют цитозольную двуспиральную РНК (dsRNA) и участвуют в передаче сигнала ISG, включают ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I), и ген 5, связанный с дифференцировкой меланомы (MDA5). Эти ферменты связываются со стимулятором 1 IFN-промотора (IFN-promoter stimulator 1 – IPS или MAVS) для активации ТКВ1 и ИККε, аналогично активации ISGs STING. Цитозольная ssRNA связывается с TLRs 7 и 9 и продуцирует IFN-ответ I типа независимым от STING способом, сигнализируя через первичный ответ на дифференцировку миелоидов (MyD88) и TIR-домен, содержащий адаптер, индуцирую-

щий интерферон- β (TRIF). Недавние исследования экзосом показали, что они способны переносить РНК (exoRNA) из опухолевых стромальных клеток и активировать RIG-1 на соседних опухолевых клетках [26, 31, 32, 56, 110, 123].

7.2.4. Иммуносупрессивные эффекты лучевой терапии (Immunosuppressive Properties of RT)

Циркулирующие клетки периферической крови подвергаются риску повреждения в ходе облучения. Например, стандартный курс ЛТ глиобластомы головного мозга 60 Гр в 30 фракциях сопряжен с получением дозы $\geq 0,5$ Гр для 99% циркулирующих клеток крови. Аналогичные изменения происходят при конвенциональной ЛТ брюшной полости, особенно при попадании в поле облучения селезенки (при раке пищевода, поджелудочной железы, печени) [22].

По сравнению с обычной фракционированной ЛТ радиационно-индуцированная лимфопения после SBRT/SRS возникает значительно реже. Для уменьшения ее риска некоторые авторы предлагают использовать протонную лучевую терапию и, возможно, разработку последних лет – мгновенное подведение сверхмощных доз излучения – FLASH RT – «облучение – вспышка» [42, 43].

Лучевая терапия может индуцировать выработку трансформирующего фактора роста бета (transforming growth factor beta – TGF β), который является центральным ингибирующим регулятором иммуносупрессивной сети. Системное введение блокирующих антител к TGF β индуцировало устойчивый ответ CD8+ Т-клеток. Также облучение способствует накоплению инфильтрирующих опухоль регуляторных Т-клеток (regulatory T cells – Tregs). Однократные абляционные дозы ЛТ вызывают инфильтрацию опухоли CD8+ Т-клетками в течение недели после облучения с последующим увеличением доли CD4+CD25+ Treg, уменьшающих воспалительную реакцию. Напротив, гипофракционированная ЛТ (более 7,5 Гр за фракцию) индуцировала пролиферацию CD8+ Т-клеток без увеличения Tregs. Интересно, что клетки Лангерганса, эпидермальные DC, устойчивы к ЛТ и демонстрируют остановку клеточного цикла с p21-опосредованным увеличением экспрессии Cdkn1a.

Кроме того, облученные клетки Лангерганса повышали регуляцию молекул МНС класса II, мигрировали в дренирующие лимфати-

ческие узлы и инициировали пролиферацию Treg после облучения. Субабляционная ЛТ увеличивает накопление CD11b+ миелоидных клеток, которые способствуют васкулогенезу и регенерации опухоли. Рост опухоли после неэффективного облучения опосредуется путем CXCL12-CXCR4/CXCR7, которые увеличивают выживаемость стволовых клеток, рекрутирует стромальные клетки из костного мозга, и индуцирует ангиогенез, обеспечивая выживание опухолевых клонов. Воздействие на этот путь с помощью ингибиторов CXCR4, таких как плериксафор, может быть эффективным инструментом предотвращения рецидивов после ЛТ [86, 110, 115, 117].

7.2.5. Уход опухоли (адаптивное уклонение) от иммунного ответа и радиорезистентность (Immune Evasion by Tumors and Radioresistance)

Прогрессирование опухоли после лечения проходит через несколько этапов:

- 1) элиминация мутировавших клеток с помощью иммунного надзора;
- 2) стадия равновесия и покоя;
- 3) адаптивное уклонение от иммунного распознавания, подавление иммунной системы и включение ее элементов в механизмы опухолевого роста.

Все клетки экспрессируют МНС класса I на своей поверхности, предоставляя образцы эндогенных пептидов, загружаемых в эндоплазматическом ретикулуме (endoplasmic reticulum – ER) для обеспечения иммунного распознавания. В МНС могут быть загружены и чужеродные белки (вирусные антигены или пептиды из мутировавших онкогенов в опухолевых клетках). Часто опухолевые клетки для ухода от ответа снижают экспрессию антигенов в МНС класса I из-за эпигенетического подавления экспрессии генов. В процессе эволюции и селекции опухоли адаптивное уклонение включает в себя потерю антигенных свойств и формирование неиммуногенных клонов.

Адаптивное уклонение путем иммунного редактирования является одним из факторов развития резистентности к иммунотерапии. Так, примерно у 20% пациентов, получающих анти-PD1 терапию, развивается иммунная резистентность после хорошего первоначального ответа. Молекулярный анализ биоптатов из рецидивных очагов меланомы показал потерю β 2-микроглобулина, приводящую к сни-

жению экспрессии МНС класса I на клеточной поверхности, потерю функции отсечения мутации Jak1 и Jak2, приводящую к снижению сигналов IFN γ и увеличению выживаемости опухолевых клеток.

Аналогичным образом у пациентов, не получающих терапию анти-CTLA4, наблюдалась потеря генов IFN I типа (IFN- α и IFN- β) и мутации с утратой функции как в сигналах IFN I типа, так и в сигналах IFN γ . Хроническая интерфероновая сигнализация также может развивать иммунную резистентность путем эпигенетической регуляции STAT1 и индукции нескольких избыточных иммунных контрольных белков, таких как ген активации лимфоцитов 3 (lymphocyte-activation gene – LAG3), Т-клеток, содержащих иммуноглобулин и муцин-домен-3 (mucin-domain containing-3 – Tim3) в опухолевых клетках. IFN I типа способствуют презентации антигенов опухолевых клеток, сенсибилизируя иммунные клетки киллеры, активируя НК, и усиливают адаптивный ответ Т-клеток

Однако хроническое воздействие IFN I может привести к иммуносупрессии с повышенной секрецией IL-10 и усилением регуляции лиганда 1 программируемой клеточной гибели (programmed death ligand – 1PD-L1). В опухолевых клетках в качестве механизма ухода от иммунного ответа часто подавляется сигнализация IFN I через альфа-и бета-рецепторы интерферона 1 (interferon alpha и beta receptor 1 – INFAR), которая включает фосфорилирование STAT1 и STAT2, образование комплекса ISGF3 с регуляторным фактором 9 интерферона (interferon regulatory factor 9 – IRF9) и транслокацию в ядро для активации ISGs.

Помимо возможности адаптивной устойчивости к иммунотерапии рака у ряда солидных опухолей существует путь возникновения «иммунно-привилегированного участка – immune-privileged site», при котором исключается проникновение иммунных эффекторных клеток в ТМЕ.

Этот врожденный механизм уклонения опухолей зависит от aberrантных сигнальных путей, например, специфичная для меланомы активация пути Wnt- β -катенина исключает Т-клетки из ТМЕ. Вакцинация и адаптивный перенос цитотоксических Т-клеток не смогли вызвать ответ, но внутриопухолевая инъекция CD103+, Batf3+ DC восстанавливала инфильтрацию Т-клеток и ответ на терапию иммунными контрольными точками.

Показано, что инфильтрация эффекторных Т-клеток в ТМЕ зависит от хемокина CXCL10, который секретируется CD103+ Batf3+

DC и от наличия мутации PTEN. Опухоли нередко пытаются уклониться от иммунного распознавания и фагоцитоза через APC посредством экспрессии маркера CD47 – «не ешь меня – don't eat me». Как CD47, так и PDL1 находятся под транскрипционным контролем Мус, тем самым предоставляя с-Мус в качестве глобального иммунного регулятора. Блокада оси CD47 – сигнал альфа-регуляторного белка (signal regulatory protein alpha SIRPalpha) способна усиливать реакции IFN I типа в DC над макрофагами за счет активации НАДФН-оксидазы (NADPH oxidase – NOX2), ослабляющей окисление фагосомы и задерживая деградацию ДНК.

Само микроокружение опухоли (TME – tumor microenvironment) может быть иммуносупрессивным. Этому способствуют такие факторы, как отсутствие инфильтрации иммунными эффекторными клетками; дезорганизованная сосудистая сеть; десмопластическая реакция; инфильтрация опухолевыми иммунными клетками, подобными Treg и миелоидными супрессорными клетками (myeloid derived suppressor cells – MDSC); и, наконец, наличие иммуносупрессивной цитокиновой среды.

Дефектная сосудистая сеть опухоли характеризуется нарушением проницаемости и способствует повышению интерстициального давления, что может привести к снижению доступности лекарств и уменьшению экстравазации иммунных клеток. В опухолях присутствует большая популяция иммуносупрессивных стромальных клеток, таких как MDSC, ассоциированных с опухолями фибробластов (cancer-associated fibroblasts – CAF) и ассоциированных с опухолью макрофагов (tumor-associated macrophages – TAM). TAM и CAF играют ключевую роль в создании избыточного внеклеточного матрикса (extracellular matrix – ECM), взаимодействуя друг с другом, чтобы вызвать десмопластическую или фиброзную реакцию, еще больше затрудняющую доступность цитотоксических иммунных клеток, отделяя опухолевые клетки от кровеносных сосудов, снижая проницаемость последних. TAM, составляющие значительную часть резидентных иммунных клеток в солидных опухолях, влияют на ингибирование инфильтрирующих цитотоксических Т-клеток и могут быть охарактеризованы как M1 (противоопухолевые) и M2, протуморогенные.

DC представляют собой очень небольшую популяцию иммунных клеток, но те, которые находятся в опухоли, приводят к индукции иммуносупрессивных Treg и ингибированию цитотоксических

Т-клеток. Эти стимулирующие опухоль иммунные клетки секретуют цитокины и факторы роста, такие как TGF β , IL-10 и VEGF, которые способствуют общему иммуносупрессивному ТМЕ. Другой иммуносупрессивной молекулой, широко представленной в опухоли, является индоламин-2,3-диоксигеназа (indoleamine 2,3-dioxygenase IDO), она обладает толерогенной активностью в отношении Т-клеток и DC, а также участвует в рекрутинге MDSC. IDO может защитить опухоль от апоптоза, индуцированного IFN, а последующим ее эффектом является преобразование CD4 + клеток в Treg.

Многие опухолевые клетки также экспрессируют AXL рецептор тирозинкиназы, которая играет центральную роль в прогрессировании опухоли, эпителиально-мезенхимальном переходе и участвует в радио- и иммунотерапевтической устойчивости. Он участвует в противовоспалительном иммунном ответе посредством множества механизмов, включая снижение активации DC и NK и содействие поляризации макрофагов M2 и толерантности Т- и В-клеток.

Присутствие иммуносупрессивных Treg в необлученных отдаленных неопластических очагах может подавлять радиационно-индуцированный иммунитет в облученных первичных опухолях в процессе, называемом сопутствующей иммунной толерантностью. Опухоль-специфическое ингибирование радиационно-опосредованной вакцинации *in situ* удаленными необработанными опухолями можно обойти путем временного истощения Treg системными анти-CTLA4 агентами, или путем облучения всех опухолей, что снижает специфичную для опухоли инфильтрацию Treg.

Таким образом, учитывая, что опухоли адаптируются к иммунному ответу, возможным решением этой проблемы может быть комбинация высокодозной, в том числе абляционной лучевой терапии и иммунотерапии [57, 61, 77, 95, 99, 110, 126].

7.2.6. Иммуномодулирующие свойства лучевой терапии и их связь с дозами и фракционированием (Radiation as an Immunomodulatory Drug: Effect of Dose and Fractionation of RT)

Длительное фракционированное облучение низкими дозами позволяет включать механизмы перераспределения в клеточном цикле, реоксигенации, репарации сублетальных повреждений и репопуляции опухолевых клеток.

Как правило, такая схема лечения сопряжена с иммуносупрессивными эффектами. Иммунные эффекторныe клетки чрезвычайно чувствительны к ЛТ. LD50 (летальная доза для половины лимфоцитов) составляет всего 2 Гр. То есть 50% лимфоцитов в целевом объеме уничтожаются после каждой из 25-30 фракций обычного курса конформной ЛТ, что может индуцировать лимфопению и ухудшать прогноз. Фракционированное облучение в течение нескольких недель истощает инфильтрирующие опухоль активированные Т-клетки.

Фракционированная ЛТ с низкими дозами за фракцию (0,5-2 Гр) модулирует микроокружение опухоли, увеличивает ее перфузию, воздействует на макрофаги и Treg, проникающие в опухоль и обладает иммуносупрессивными свойствами, снижая эффективность иммунотерапии. Соответственно, изучаются возможности применения гипофракционирования (реже гиперфракционирования) для улучшения непосредственных и отдаленных результатов ЛТ.

Абляционная ЛТ обеспечивает LC >90% и иммунную гибель опухолевых клеток. Субабляционное фракционирование увеличивает экспрессию иммуномодулирующих молекул на поверхности опухолевых клеток, тем самым повышая восприимчивость выживших опухолевых клеток к атаке цитотоксических Т-клеток (CTL), то есть происходит вакцинация *in situ*. Фракционированная ЛТ с низкими дозами за фракцию (0,5-2 Гр) модулирует микроокружение опухоли, увеличивает перфузию опухоли, воздействует на макрофаги и Treg, проникающие в опухоль и обладает иммуносупрессивными свойствами, снижая эффективность иммунотерапии.

Таким образом, ***иммуномодулирующие свойства лучевой терапии определяется дозой, а также режимом фракционирования*** и могут проявляться тремя типами ответа:

- а) иммуноаблятивным при использовании высоких доз;
- б) собственно иммуномодулирующим при применении средне-высоких доз;
- с) модулирующим микроокружение опухоли (TME) при облучении низкими дозами (классическом фракционировании).

а) Иммуноаблятивное облучение при использовании высоких доз (Immuno-ablative RT – IART)

IART проводится в 1-5 фракциях >10 Гр за фракцию и позволяет добиться показателей локального контроля >90%. SABR/SRS вызы-

вают прямую гибель клеток, высвобождая большое количество антигенов и DAMP-сигналов, обеспечивая эффективный противоопухолевый иммунный ответ, вызывает дозозависимое увеличение экспрессии МНС и оптимизацию регуляции МНС класса I на выживших опухолевых клетках, предотвращая уход от иммунного ответа. Недостатками абляционного облучения являются повышение экспрессии иммуноингибирующего лиганда молекулы PDL1, индукция проопухолевого фиброзного ответа (pro-tumor fibrotic response) и привлечение иммуносупрессивных клеток в ТМЕ, что в совокупности может уменьшить ответ [52, 110].

б) Иммуномодулирующая ЛТ при применении средневысоких доз (Immunomodulatory RT – IMRT)

IMRT обычно проводится в 3-5 фракциях по 5-10 Гр за фракцию. Методика обычно используется при близком расположении опухоли к критическим органам (спинной мозг, двенадцатиперстная кишка, ствол головного мозга и др.) [48, 110].

Группа J.W. Hodge et al. в National Cancer Institute (2014, NCI, USA) показала, что ЛТ обеспечивает иммунную атаку цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), в результате того, что дозозависимо индуцирует:

- ✓ экспрессию на поверхности клеток белков МНС класса I, рецепторов смерти и калретикулина (calreticulin);
- ✓ рецепторов Fas/CD95 (из семейства TNF факторов некроза опухоли);
- ✓ маркёров адгезии, таких как молекула межклеточной адгезии 1 (intercellular adhesion molecule 1 – ICAM-1/ CD54);
- ✓ антигена 3, связанного с функцией лимфоцитов (lymphocyte function-associated antigen 3 – LFA-3/ CD58);
- ✓ высвобождение хемокинов, включая CXCL10 и CXCL16, привлекающих эффекторные Т-клетки в опухоль и в то же время уменьшающих приток иммуносупрессивных регуляторных Т-клеток.

В исследовании S. Demaria et al. (2015) продемонстрирована способность субабляционного гипофракционированного излучения (8 Гр×3 фракции) синергически сочетаться с иммунотерапией блокадой контрольных точек CTLA-4 и вызывать абскопальный эффект необлученных опухолей за счет радиационно-индуцированного системного противоопухолевого эффекторного ответа. Механизм абскопального эффекта был связан с индукцией цитозольной экзо-

нуклеазы первичной репарации 1 (TREX1 – three prime repair exonuclease 1). Эти результаты позже нашли подтверждение в рандомизированном исследовании II фазы PEMBRO-RT (NCT02492568), доказавшем эффективность комбинации SBRT + анти-PD1 терапии по сравнению только с анти-PD1 у пациентов с распространенным раком легких.

Оптимальные режимы фракционирования и дозы IMRT к настоящему времени не определены и находятся на стадии изучения. Использование лучевой «вакцинации *in situ*» с применением субабляционных доз облучения пока не показало существенной иммунной активации микроокружения опухоли (TME), отчасти из-за постабляционного рекрутирования миелоидных клеток и васкулогенеза, опосредованного HIF-1-зависимым фактором-1, производным от стромальных клеток (stromal cell-derived factor-1 – SDF-1) и его рецептором CXCR4 [34, 53, 110].

с) Облучение, модулирующее микроокружение опухоли при использовании низких доз – классическом фракционировании (Tumor Microenvironment Modulating RT – TMEM-RT).

Облучением, модулирующим микроокружение опухоли, считается классическое фракционирование с использованием низких доз (2 Гр и менее). Отмечено, что после проведения конвенциональной ЛТ незрелая, извилистая, с нарушением проницаемости опухолевая сосудистая сеть в значительной степени нормализуется, обеспечивая более эффективную перфузию и повышая доступность опухоли для иммунокомпетентных клеток и иммунных препаратов. F. Klug et al. (2013) продемонстрировали, что облучение низкими дозами может фактически перепрограммировать макрофаги на провоспалительный фенотип M1 [65, 74, 88, 110].

Глава 8. Немишенные радиобиологические эффекты

Вообще, немишенные эффекты не уникальны для радиобиологии. Они могут быть индуцированы радиационным воздействием, химическими соединениями, физическими воздействием (ультразвук, гипо- и гипертермия), биологическими и другими агентами, вызывающими стресс. Радиационно-индуцируемый «эффект свидетеля» может быть вызван всеми типами излучений: α , β , γ и рентгеновским.

Ряд феноменов лучевой терапии, и в первую очередь немишенные радиобиологические эффекты можно описать и объяснить только на стыке трех основных моделей радиобиологии: линейно-квадратичной, сосудистой и иммунной.

Изначально считалось, что биологические эффекты ионизирующих излучений возникают в облученных клетках как результат поражения ДНК.

То есть предполагали, что:

- 1) биологические эффекты имеют место только в облученных клетках;
- 2) прохождение излучения через ядро клетки является предпосылкой для возникновения биологической реакции;
- 3) ДНК является молекулой-мишенью в клетке.

Позже возникло понимание роли сосудистых механизмов за счет прямого и непрямого эндотелиального повреждения, а также иммунных звеньев радиобиологии.

Со временем стали накапливаться неопровержимые доказательства существования эффектов излучения, возникающих вдали от зоны облучения (мишени), в клетках, избежавших прямого лучевого повреждения.

Таким образом, немишенными радиобиологическими эффектами определяются явления, наблюдаемые в клетках, которые не подвергались непосредственному радиационному воздействию, которые могут проявляться как «во времени» (отсроченная нестабильность генома), так и «в пространстве» («эффект свидетеля») [5, 6, 8, 87].

В докладе НКДАР-2006 (Научный комитет Организации Объединенных Наций по действию атомной радиации; The United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation-UNSCEAR; 2009) [113] определены конечные события («end point») немишенного действия радиации: повреждение ДНК, нестабильность генома, частота аббераций хромосом, частота сестринских хроматидных обменов и микроядер, транспозиция хромосомных локусов, клонотипная выживаемость, генные мутации, изменение генной экспрессии, эффективность посева, уровень белков апоптоза и шаперонов, степень апоптоза, остановка клеточного цикла, активность некоторых ферментов (например, нуклеаз), уровень кальция, концентрация активных форм кислорода и азота, потенциал митохондриальных мембран, частота онкогенной трансформации, стимуляция митогенного сигнала, адаптивный ответ, активация пролиферации и другие показатели повреждения/стимуляции [5].

Нет четкого терминологического согласия в отношении эффектов, возникающих в клетках, не подвергнутых воздействию ионизирующей радиации в присутствии облученных клеток – т.е. абскопального эффекта и «эффекта свидетеля». Некоторые авторы считают, что «эффект свидетеля» – это проявление феномена *in vitro*, «abscopal effect» – проявление того же феномена в том числе и *in vivo*, на уровне организма.

К основным проявлениям немишенного действия радиации относятся (рис. 4):



Рис. 4. Схематическое изображение немишенного действия радиации.

1. **Радиационно-индуцированная геномная нестабильность** – биологические эффекты (мутации, хромосомные aberrации и изменения в экспрессии генов), которые возникают у дальних потомков облученных клеток.

Основные особенности радиационно-индуцированной геномной нестабильности:

- a) явление наблюдается у 10-30% клеток популяции;
- b) отмечается наличие нескольких генетических последствий, включающих устойчивое возрастание частоты репродуктивного нарушения и апоптоза у потомков облученных клеток;
- c) возникновение генетических изменений у отдаленных потомков облученных клеток (через 10-30 поколений);
- d) наличие устойчивого окислительного стресса – в том числе повышенного уровня активных форм кислорода в нестабильных популяциях клеток;
- e) индуцированные мутации отличаются по спектру молекулярных структурных изменений от мутаций, связанных с непосредственным облучением. Если при прямом облучении мутации являются результатом частичной или полной делеции генов, то в нестабильных клетках они преимущественно точечные, что согласуется с наличием в них окислительного стресса;
- f) зависимость доза-эффект для индукции нестабильности проявляется насыщением при достаточно низких дозах (0,1-0,2 Гр). Нестабильность индуцируется только в части облученной популяции ($\approx 10\%$). С повышением дозы облучения наблюдается небольшое увеличение доли нестабильных клеток [6, 8, 87].

2. **Абскопальный эффект** и его частное проявление – «**эффект свидетеля**» («**эффект соседа**», «**bystander-effect**») – биологические эффекты в смешанной популяции облученных и необлученных клеток возникают в клетках, которые не подвергались непосредственному радиационному воздействию.

➤ *Помимо основных эффектов в концепцию немишеных эффектов включают:*

3. **Радиационный гормезис** – благоприятное воздействие малых доз облучения (термин предложен в 1980 году T.D. Luckey) [72]. Вообще гормезис (иногда гермезис) (от греч. *hórmēsis* быстрое движение, стремление) – стимулирующее действие умеренных доз стрессоров; стимуляция какой-либо системы организма внешними воздействиями, имеющими силу, недостаточную для проявления вредных

факторов. Термин введен С. Зонтманом и Д. Эрлихом в 1943 г. Механизм радиационного гормезиса на уровне клетки теплокровных животных состоит в иницировании синтеза белка, активации гена, репарации ДНК в ответ на стресс-воздействие малой дозы облучения (близкой к величине естественного радиоактивного фона). Эта реакция в конечном итоге вызывает активацию мембранных рецепторов, пролиферацию клеток и стимуляцию иммунной системы [6, 8, 87].

4. *Адаптивный ответ.*

5. *Начальная гиперчувствительность.*

6. *Индукцированная радиорезистентность.*

Радиационно-индуцированный адаптивный ответ заключается в уменьшении радиочувствительности клеток и организмов в целом после воздействия вначале малой дозой радиации, а затем – повреждающей дозой. Сложную совокупность механизмов адаптивного ответа можно объяснить генерацией «сигнала опасности», переводящего клетку в новое физиологическое состояние с мобилизацией защитных механизмов поддержания гомеостаза [7].

Абскопальный эффект (abscopal effect, от лат. 'ab' - 'от', и греч. 'skopos' – 'мишень') – это немишенный эффект радиации, заключающийся в передаче радиационных сигналов от облученных клеток необлученным. Прежде всего речь идет о передаче сигналов апоптоза гибнущими клетками опухоли. Предполагается, что основным механизмом его возникновения является интенсивная стимуляция иммунной системы при массивной экспрессии опухолевых антигенов, в том числе комплекса гистосовместимости, вызванной повышением мембранной проницаемости.

Немишенные эффекты радиации стали замечать на заре возникновения радиобиологии и радиотерапии, на самых первых этапах изучения взаимодействия облучения и живых тканей. Еще в 1950-е гг. было показано, что плазма крови облученных людей и животных способна повреждать необлученные клетки, тогда же был предложен термин «кластогенные факторы плазмы» [85]. Наличие кластогенных разрушающих факторов продемонстрировано у пострадавших в Хиросиме и Нагасаки, Чернобыльской катастрофе и у пациентов после радиотерапии.

Абскопальный эффект изначально был описан при радиотерапии опухолей как крайне редкий феномен исчезновения отдалённых ме-

тастазов при локальном применении радиотерапии (системный эффект локальной радиотерапии). Термин введен R.J. Mole в 60-х гг. XX века для описания эффекта уменьшения опухоли, не подвергшейся облучению, после облучения другой опухоли (у 52-летнего мужчины со злокачественной лимфомой). В 2004 г. Sandra Demaria и Sylvia Formenti сформулировали гипотезу иммуно-индуцированной его природы [7, 31, 32].

Эффект свидетеля (радиоиндуцированный эффект; коммунальный эффект; bystander effect; RIBE – Radiation-Induced Bystander Effect) – является частным случаем абскопального эффекта, но часто используется как синоним. Именно необлученные клетки и предполагаются воспринимающими «свидетелями» лучевых событий.

Особенностью немишенных эффектов предполагается то, что воздействие на необлученные клетки провоцирует геномную нестабильность, хромосомные aberrации и апоптоз. Одной из его причин может быть повреждение ДНК здоровых клеток за счет переноса канцерогенов, выделяемых облученными клетками. Радиационное повреждение ДНК, митохондрий и других клеточных структур приводит к выделению, окисленной ДНК, микроРНК, образованию реактивных форм кислорода (ROS – reactive oxygen species) за счет радиолиза воды. В ответ на это лимфоциты и макрофаги выделяют различные про- и противовоспалительные цитокины, такие как IL-1, IL-6, IL-33, TNF α , TGF β и другие белковопептидные сигнальные молекулы.

Цитокины переносятся к непораженным клеткам, где через активацию MAPKs и NF- κ B сигнальных путей вызывают увеличение экспрессии циклооксигеназы-2 (COX-2), индуцированной NO-синтазы и НАДФН-оксидазы, которые провоцируют образование ROS и реактивных форм азота (NO), вызывая вторичное воздействие ионизирующего излучения. Особое значение в процессе переноса канцерогенов играют экзосомы, выступающие резервуарами для микроРНК, мРНК, белков и фрагментов ДНК.

Ключевую роль в канцерогенезе в клетках-свидетелях играет фермент COX-2, который участвует в синтезе простагландинов, в том числе и PGE2. Помимо регуляции ряда физиологических процессов PGE2 провоцирует развитие опухолей за счет стимулирования клеточной пролиферации с одновременным снижением апоптоза, а также индукции иммуносупрессии. Важным моментом для возник-

новения немитогенных абскопальных эффектов является статус белка p53, поскольку от него зависит, какой профиль цитокинов будут секретировать облученные клетки [6, 8, 87].

Абскопальный эффект является одной из причин сдвига парадигмы современной радиобиологии.

Он может быть обусловлен по крайней мере двумя механизмами:

1) межклеточными контактами («gap junction»), включающими Trp53-опосредуемый путь проведения сигнала повреждения;

2) секрецией медиаторов – активных форм кислорода, цитокиноподобных факторов, белков, ROS, NO, экзосом, фрагментов ДНК и пр.

Не исключено, что в механизмах передачи RIBE задействованы и физические факторы.

Межклеточные контакты (щелевые/зазорные контакты – англ. – gap junctions) – обеспечивают прямой перенос ионов и небольших молекул (массой до 1,2 кДа) между соседними клетками. Обменными молекулами могут быть сахара, нуклеотиды, вторичные посредники (цАМФ или цГМФ), небольшие пептиды и РНК. Каналы щелевых контактов имеют цилиндрическую форму и состоят из двух половин – коннексонов, или полуканалов. Каждый коннексон имеет шесть белковых субъединиц – коннексинов. Проницаемость щелевых контактов регулируется путём открытия и закрытия ворот канала (гейтинг). Гейтинг, в свою очередь, контролируется изменением клеточного рН, концентрацией ионов кальция или непосредственным фосфорилированием коннексинов. В геноме человека закодировано не менее 20 различных коннексинов. Через щелевые контакты главным образом обеспечивается перенос ROS, NO, продуктов перекисного окисления липидов, различных вторичных посредников (Ca^{2+} , циклический АМФ) [6, 8, 87].

Экспериментально феномен убедительно доказывается как *in vitro*, так и *in vivo*.

✓ *Экспериментальные модели in vitro:*

1. Микропучком ионизирующего излучения проводится непосредственная экспозиция только части клеточной культуры, а эффекты (повреждение и стимуляция) регистрируются для большего числа клеток. Данный подход реализован и для радиации с высокой латентной передачей энергии (α -частицы), и для сфокусированных микропучков ультрамягкого рентгеновского излучения. Для обычно-

го редкоизионизирующего излучения использование техники микропучков невозможно (уже при дозе γ -излучения в 5 мГр поражается 85% клеточных мишеней, в то время как для α -частиц – только 0,4%).

2. Необлученные клетки помещаются в среду, полученную после инкубации в ней облученных клеток. Именно этот подход обычно используют для редкоизионизирующего излучения [5].

✓ *Экспериментальные модели in vivo:*

1. Введение мышам смеси, облученных ионизирующей радиацией и необлученных клеток, например, костного мозга (меченных цитогенетическим маркером).

2. Инкубация необлученных клеток в среде от облученных в процессе радиотерапии тканей (*ex vivo*) [5].

Невысокая частота абскопальных эффектов отчасти связана с тем, что даже праймированные CD8+ Т-клетки не способны преодолеть супрессивное воздействие опухолевого микроокружения. Выделяемые опухолью иммуносупрессирующие цитокины, такие как TGF β и поверхностные рецепторы, экспрессируемые на Т-лимфоцитах (CTLA4; PD-1), могут приводить к снижению Т-клеточной функции. M2-макрофаги, клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSCs) и незрелые дендритные клетки приводят к супрессии Т-клеточного иммунного ответа. Элиминация опухоли также может замедляться Т-регуляторными лимфоцитами (CD4+ Т-клетками с регуляторной функцией).

Иммунотерапия обычно оказывается более эффективной при опухолях, хорошо и избыточно инфильтрированных дендритными и CD8+ Т-клетками (так называемый Т-клеточный «воспалительный фенотип»; «горячая» опухоль). Однако на практике чаще встречаются «холодные» опухоли, что является одной из причин низкой эффективности ингибиторов контрольных точек. Именно радиационно-индуцированный иммунный ответ в ряде случаев может превратить «холодную» опухоль в «горячую».

Эффект свидетеля бывает не только повреждающим, но и стимулирующим с формированием сигналов к адаптивному ответу и гормезису [5]. В целом, радиоиндуцированные немишеные эффекты могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние. Положительный (активирующий и адаптирующий) абскопальный эффект отчетливо определяется в нормальных клетках *in vivo*, но не

фиксируется (ни положительный, ни отрицательный) *in vitro* при малых дозах редкоизирующего излучения (до 0,1-0,2 Гр).

Соответственно и на результаты лучевой терапии может оказываться как радиопротекторное воздействие (обратный абскопальный эффект), так и радиосенсибилизирующее. Сложно предсказать какой эффект будет преобладать в каждом конкретном случае, однако статистически чаще регистрируются отрицательные. Проводятся исследования стволовых клеток показывающие, что мезенхимальные стволовые клетки костного мозга и эмбриональные стволовые клетки не имеют характерных абскопальных повреждений. Перспективы учета радиоиндуцированных немишенных эффектов при определении вероятности проявления стохастических эффектов и расчете канцерогенных рисков до конца не изучены [6, 8, 87].

Глава 9.

Алгоритмы возможных сочетаний облучения с системным лечением (химиотерапией и иммунотерапией)

На основе изучения в представленных радиобиологических моделях механизмов эффектов, свойственных лучевой терапии, в последнее время активно используются различные комбинации облучения с системным лечением.

Доказано, что совместное использование ионизирующего излучения, системной терапии и иммунотерапии может генерировать противоопухолевый иммунитет за счет воздействия на все звенья противоопухолевого ответа:

- 1) Повреждение ДНК.
- 2) Сосудистые факторы.
- 3) Индукция иммуногенной гибели клеток (immunogenic cell death – ICD).
- 4) Модуляция микроокружения опухоли (tumor microenvironment – TME).
- 5) Включения немишеных механизмов.

Комбинированные методы лечения могут быть нацелены на каждый из этих этапов в отдельности, или сразу на несколько звеньев. Синергические эффекты двойной или тройной комбинации являются предметом многочисленных исследований. Можно пытаться усилить опухолеспецифические иммунные реакции для каждого конкретного пациента с учетом дозы и фракционирования ЛТ, типов иммунотерапевтических агентов и базового иммунофенотипа опухоли [110].

При решении вопроса о необходимости комбинации иммунотерапии с ЛТ следует определить её цель: 1) иммунотерапия проводится в связи с недостаточной эффективностью субабляционной ЛТ, связанной с ограниченной толерантностью нормальных тканей и критических структур; 2) или наоборот, лучевая терапия проводится для повышения эффективности и расширения спектра противоопухолевого иммунного ответа.

Абскопальные эффекты являются косвенным и суррогатным показателем клинической эффективности лечения, основным критерием остаются конечные точки общей выживаемости. Для того, чтобы противоопухолевая вакцинация *in situ* была эффективной, необходим

неповрежденный цикл иммунного ответа на опухоль, каждый последующий этап которого связан с предыдущим и следует из него.

Эти этапы включают:

- высвобождение и поглощение ассоциированных с опухолью антигенов антигенпрезентирующими клетками, особенно дендритными (DC);
- активацию и созревание DC;
- перекрестную презентацию антигенов Т-клеткам, активацию Т-клеток и обеспечение их доступа к опухоли.

9.1. Классификация микроокружения опухоли (ТМЕ)

Классификация микроокружения опухоли (ТМЕ) по его иммуногенному потенциалу позволяет персонализировать наиболее эффективные подходы к определению лечебной тактики.

M.W. Teng et al. (2015), а затем D.M. Trifiletti, T. Savage et al. (2019) были разработаны и предложены к использованию алгоритмы оптимального сочетания иммунотерапии с SBRT, основанные на цикле радиационного иммунитета и иммунном ландшафте опухолей [102, 110].

Авторы предложили классификацию иммунного микроокружения опухоли (ТМЕ), основанную на наличии или отсутствии лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (tumor-infiltrating lymphocytes – TIL), и экспрессии PD-L1:

- 1) Тип I – TIL «+» / PD-L1«+» – имеется адаптивная иммунная резистентность;
- 2) Тип II – TIL «-» / PD-L1«-» – имеется иммунная неопределенность;
- 3) Тип III – TIL «<-» / PD-L1«+» – имеется внутренняя индукция;
- 4) Тип IV – TIL «+» / PD-L1«-» – имеется иммунологическая толерантность.

В целом, эти признаки позволяют объединить все новообразования в два основных типа: 1) иммунологически «горячие» и 2) иммунологически «холодные» опухоли.

I. Иммунологически «горячие» опухоли характеризуются наличием воспаления, обычно активно инфильтрируются лимфоци-

тами и обладают высокой мутагенной нагрузкой. Они содержат все компоненты, необходимые для эффективных иммунных реакций. Однако иммунный механизм подавляется из-за адаптивной иммунной резистентности и экспрессии молекул иммунных контрольных точек и/или инфильтрации опухоли Treg и TAM.

Кандидаты на роль иммунных контрольных точек, таких как PD-L1, PD-L2, TIM3 и LAG3 постоянно умножаются по мере открытия новых путей адаптивной резистентности. Опухоли, экспрессирующие высокие уровни PD-L1, могут хорошо реагировать на анти-PD1/PD – L1 блокаду иммунных контрольных точек (immune checkpoint blockade – ICB), но затем снижать эффективность за счет включения компенсаторных механизмов.

При PDL-1 отрицательных опухолях следует рассмотреть возможность блокирования альтернативных мишеней для ICB-терапии. Так, при проведении высокодозной ЛТ (SRS/SBRT/SABR) в качестве вакцинации *in situ* можно использовать IART с введением Flt3L.

Если ограничения дозы для органов риска не позволяют использовать абляционное фракционирование, то можно сочетать субаблятивную иммуномодулирующую ЛТ с ICB, наряду с другими методами лечения, такими как активация антител против CD40.

Поскольку ЛТ индуцирует экспрессию рецепторов клеточной смерти на поверхности опухолевых клеток, после облучения для повышения эффективности иммунотерапии дополнительно может использоваться перенос адаптивных клеток с активированными цитокинами Т-клетками или химерными антигенными рецепторами, экспрессирующими Т-клетки (chimeric antigen receptor expressing T – CAR-T). В качестве альтернативы TAM могут быть нацелены на блокирование антител к рецептору CSF-1 или IDO ингибиторов [110].

II. Иммунологически «холодные» опухоли характеризуются низкой инфильтрацией лимфоцитов и могут быть дополнительно классифицированы на опухоли 1) с высокой мутационной нагрузкой и 2) с низкой мутационной нагрузкой.

Считается, что опухоли с низкой инфильтрацией и высокой мутационной нагрузкой участвуют в уклонении и уходе от иммунного ответа. Оптимальными методами лечения такого иммунофенотипа опухолей могут быть антиангиогенные, антистромальные методы лечения, неаблятивное ультразвуковое воздействие и TМЕМ-RT для

увеличения перфузии и доступности опухоли для Т-клеток. Эти методы лечения могут сочетаться с абляционной ЛТ, чтобы синергически индуцировать опухолевый ответ.

Опухоли с низкой инфильтрацией лимфоцитов и низкой мутационной нагрузкой, с экспрессией PD-L1 или без нее считаются невосприимчивыми к иммунным реакциям и должны лечиться терапией ТМЕМ для перепрограммирования ТМЕ в пользу инфильтрации и функционирования эффекторов. Комбинации ЛТ, Flt3L и анти-CD40 или агониста TLR9 могут способствовать созреванию и активации APC до степени, когда можно индуцировать презентацию антигена и активацию Т-клеток [25, 75, 102, 110].

9.2. Лучевая терапия и химиотерапия

Не только ЛТ, но и ХТ сама по себе обладает как прямой цито- и генотоксичностью (летальные и сублетальные повреждения ДНК), так и может способствовать повышению иммуногенности опухоли и модификации опухолевого иммунного ответа, индуцируя ICD, нарушая пути иммуносупрессии и усиливая ответ эффекторных Т-клеток.

Преимущества индукционной химиотерапии при лечении местнораспространенного НМРЛ впервые убедительно продемонстрированы в рандомизированном клиническом исследовании (РКИ) CALGB 8433 (n=155), в котором сравнивались эффективность только ЛТ (60 Гр) с ХЛТ, включающей комбинацию цисплатина и винбластина с последующим облучением. Было показано, что индукционная химиотерапия статистически значимо увеличивает как медиану общей выживаемости – OS 9,7 vs. 13,8 мес., так и 5 летнюю OS – 6% vs. 17% (p=0,012) [35].

Позже было доказано, что одновременная (синхронная) ХЛТ превосходит индукционную (последовательную). Так, в РКИ (n=320), сравнивающей синхронную (сплит-курс) и последовательную ХЛТ (СОД=56 Гр/ РОД=2 Гр; митомицин, виндезин и цисплатин) частота объективного ответа (ЧОО) составила 84% против 66% (p=0000,2). МВ при синхронной ХЛТ была 16,5 мес., 5-летняя выживаемость – 15,8%, а в альтернативной группе – 13,3 мес. и 8,9%, соответственно (p=0,04).

Однако и миелосупрессия в группе синхронной ХЛТ была существенно выше (p=0,0001). В РКИ RTOG 9410 констатировано, что одновременная химиотерапия с приводит к улучшению OS по срав-

нению с индукционной химиотерапией (n=597; seq cis/vinbl then 60 Gy RT vs. →conc cis/vinbl 60 Gy RT vs. →conc cis/etoposide RT BID – twice-a-day).

Так, медиана OS для анализируемых групп составила 14,6 vs. 17 vs. 15,6 мес.; 5-летняя OS 10% vs. 16% vs. 13%; LF 39% vs 30% vs 29% и DM 45-47%. В метаанализе Goustaive-Roussy (6 исследований, оценивающих одновременную и последовательную химиотерапию при местнораспространенном НМРЛ; n=1205) зафиксирована 5-летняя OS 15,1% vs. 10,6%, 5-летняя LRF 29% vs. 35%, с увеличением токсичности для пищевода 18% vs. 4%, без увеличения легочной токсичности.

9.3. Лучевая (ЛТ) / химиолучевая (ХЛТ) и иммунотерапия (ИТ)

Ионизирующее излучение нацелено на повреждение ДНК, прямо или косвенно (через кислород свободных радикалов) приводя к одиночным или двойным разрывам спиралей. Репарация ДНК вполне эффективна в здоровых клетках, но недостаточна или замедлена в радиочувствительных опухолевых клетках. В дополнение к циторедуктивному эффекту недавние доклинические и ранние клинические данные свидетельствуют о том, что ионизирующее излучение может генерировать противоопухолевый иммунитет за счет индукции иммуногенной гибели клеток (ICD) и модуляции микроокружения опухоли (ТМЕ) [78].

Предполагается наличие двух различных фенотипов опухолей – «горячих» и «холодных» по характерным признакам микроокружения опухоли (наличие инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТЛ, соотношению цитотоксических CD8 + Т-клеток и Т-regs (супрессорных Т-клеток). Выше уже описывались возможности как положительного, так и отрицательного влияния радиации на опухоль. Это как иммуносупрессивное воздействие облучения на микроокружение опухоли и на повышение экспрессии ингибирующего рецептора PD-L1, так и стимулирующее, за счет увеличения высвобождения антигенов и презентации их иммунокомпетентным, в том числе дендритным клеткам.

В частности, транслокация кальретикулина в облученных опухолевых клетках, который экспрессируется на клеточной мембране, позволяет дендритным клеткам распознавать поврежденные клетки и

поглощать их путем фагоцитоза (сигнал распознавания). Еще один путь – высвобождение белка группы высокой подвижности В1 (негистоновый ядерный белок – high-mobility group protein B1 – non-histone nuclear protein) и взаимодействие с рецептором Toll 4 («сигнал опасности»).

Активированные дендритные клетки мигрируют в регионарные лимфатические узлы, где наивные Т-клетки презентруются антигенами, специфичными для опухоли, и стимулируются. Эффекторный Т-клетки возвращаются в опухоль, привлекаемые хемокинами, индуцированными облучением опухоли. Выжившие облученные клетки демонстрируют повышенную экспрессию молекул межклеточной адгезии (ICAM-1 – intercellular adhesion molecule), рецептора смерти Fas и антигенпрезентирующих молекул главного комплекса гистосовместимости класса I, которые улучшают их распознавание и уничтожение активированными противоопухолевыми Т-клетками.

Механизм, с помощью которого облученная опухоль становится источником опухолевых антигенов, можно считать аутовакцинацией *in situ* как в первичной, так и в эффекторной фазах противоопухолевого иммунитета. Облучение может стимулировать иммунную систему, активировать противоопухолевый ответ рекрутируя Т-лимфоциты и превращая «холодные» опухоли в «горячие». Поскольку радиация может вызвать лимфопению, убивая не только ТЛ, но и циркулирующие через зону лучевого воздействия лимфоциты периферической крови, необходимо проводить коррекцию и ограничение размера полей при проведении лучевой терапии [17].

ЛТ индуцирует все три основных компонента ICD, необходимых для запуска и активации иммунитета:

- повышенная экспрессия экто-калретинулина на опухолевых клетках (мощный сигнал «съешь меня – eat-me» дендритных клеток),
- внеклеточное высвобождение поврежденными опухолевыми клетками медиаторов (например, HMGB1 – high mobility group box 1, ядерный белок-агонист толл-подобного рецептора 4, который способствует транскрипции провоспалительных генов),
- высвобождение аденозин-5'-трифосфата (АТФ, участвующего в активации иммунных клеток через P2XR7 пуриnergический рецепторный путь).

Эти «сигналы опасности» способствуют презентации антигена антигенпрезентирующими клетками (antigen presenting cells – APC), такими как дендритные клетки (dendritic cells – DC), и это в свою очередь приводит к праймированию опухолевых антиген-специфических Т-клеточных ответов [78].

Кроме того, вызванное облучением накопление цитозольной ДНК стимулирует продукцию интерферонов I типа (IFN-1) DC за счет активации пути стимулятора генов интерферона (stimulator of interferon genes – STING), способствуя дополнительному праймированию противоопухолевых Т-клеток. ЛТ увеличивает уровень экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, приводя к усилению презентации антигена иммунным эффекторным клеткам (таким как DC или CD8+ Т-лимфоциты) и поддерживает рекрутирование CD8+ Т клетки за счет увеличения лигандов члена группы 2 естественных клеток-киллеров D (NKG2D).

Индукцируется выработка провоспалительных цитокинов (таких как фактор некроза опухоли [TNF], интерлейкин [IL]-1 α , и IL-6) и образование антигенов опухолевого происхождения (включая неоантигены), распознаваемых APC (такими как DC и макрофаги). Высвобождение воспалительных цитокинов вместе с иммуномодулирующими изменениями в ТМЕ и повышенной проницаемостью сосудов вследствие дисфункции эндотелиальных клеток приводит к инфильтрации активированных CD8+ Т-клеток, что может способствовать локальному и немишенному противоопухолевому эффекту [78].

Радиационно-индуцированным иммуностимулирующим эффектам противодействуют иммуносупрессивные сигналы, включая активацию трансформирующего фактора роста β (TGF β) и индукцию колониестимулирующего фактора 1 (CSF-1), которые приводят к повышенной инфильтрации супрессорными клетками миелоидного происхождения (MDSCs и других, ответственных за поддержание хронической иммуносупрессии в ТМЕ) и Treg (которые более устойчивы к радиации, чем обычные Т-клетки).

Выше уже описывался механизм радиоиндуцированной активации иммунной системы.

1. Высвобождение и увеличение количества неоантигенов.
2. Презентация неоантигенов: АТФ/НМGB-1/CALR/IFN-I.
3. Пролиферация и активация дендритных клеток и Т-клеток: АТФ/НМGB-1/CALR/IFN-I и CXCL10/CXCL 16.

4. Рекрутирование Т-клеток в облученные или необлученные опухоли: CXCL10/CXCL16, увеличение VCAM-1 на эндотелиальных клетках.

5. Инфильтрация Т-клеток в опухоли: CSF-1 из опухолевых клеток, увеличение MDSC.

6. Распознавание и уничтожение опухолевых клеток: PD-L1/МНС-1/NKG2D/FAS.

Процесс развития опухоли и осуществляемый организмом иммунологический надзор G.P. Dunn et al. (2002) описали как этап элиминации (фаза А) с переходом к последующим фазам иммуноредактирования. На втором этапе, равновесия (самая продолжительная фаза Б), оставшиеся после элиминации опухолевые клетки, вступают в динамическое равновесие с иммунной системой.

В фазе побега (фаза В) выжившая популяция опухолевых клеток приобретает нечувствительность к иммунной системе и прогрессирует в результате генетических и эпигенетических изменений, гипофункции (истощения) инфильтрирующих опухоль лимфоцитов. Несмотря на проникновение в микроокружение опухоли, инфильтрирующие опухоль лимфоциты, часто приобретают фенотип гипореактивности, характеризующийся снижением цитокинов и нарушением цитотоксичности, что связано с повышением регуляции ингибирующих рецепторов [9, 37].

9.4. Иммунные контрольные точки

Эффективность противоопухолевого иммунного ответа на лучевую терапию ограничивается феноменом иммунного ускользания, в частности через молекулы иммунных контрольных точек.

Ингибирующие рецепторы (также называемые «иммунные контрольные точки») охватывают группу молекул, целью которых является угнетение функции Т-клеток. Они являются частью ключевой контррегуляторной системы, которая предотвращает аутоиммунные процессы и чрезмерную реактивность Т-клеток.

Активация и ответ Т-клеток регулируются иммунными контрольными точками – системой сдержек и противовесов, которая в физиологических условиях предотвращает аутоиммунное заболевание и защищает ткани от чрезмерного повреждения, когда иммунная система формирует соответствующий ответ против чужеродного па-

тогена. Экспрессия белков иммунных контрольных точек может быть нарушена опухолями и является частью механизма «ускользания» при иммунном редактировании рака, а также механизмом устойчивости после образования опухоли [17].

Двумя наиболее изученными рецепторами иммунных контрольных точек в иммунотерапии рака, являются:

1. цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4 (CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4);
2. белок 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1 – programmed cell death protein 1).

Классическая гипотеза с двумя сигналами выдвигает предположение, что для активации Т-клеток необходимы как непосредственно антиген, так и вторичные раздражители. Самым ранним подтверждением этой гипотезы была идентификация лигандов В7-1 и В7-2 и их способности запускать как костимуляторный рецептор – CD28, так и противодействующий коингибирующий, связанный с цитотоксическим Т-лимфоцит-ассоциированным антигеном 4 (CTLA-4). Как только происходит активация Т-клеток, уровень CD28 снижается, а уровень CTLA-4 повышается, в результате чего происходит подавление ответа Т-клеток.

CTLA-4 представляет собой ингибирующий рецептор Т-клеток, ограничивающий активацию. Он уравнивает стимулирующий Т-клеточный рецептор CD28, который активируется путем связывания лигандов В7, находящихся на антигенпрезентирующих клетках. При презентации антигена МНС костимуляция CD28 приводит к активации Т-клеток. CTLA-4 также связывается и активируется теми же лигандами В7 (с большей аффинностью, чем CD28), но, поскольку он является ингибирующим рецептором, связывание лиганда имеет противоположный эффект, ослабляя ответ Т-клеток.

В иммуносупрессивной опухолевой среде CTLA-4 чрезмерно стимулируется постоянной презентацией антигенов, ассоциированных с опухолью, что приводит к истощению Т-клеток. CTLA-4 также экспрессируется рекрутируемыми опухолью Т-регионами, что снова приводит к подавлению Т-клеток и продукции IL-10. Наиболее известный препарат, ингибирующий этот путь и восстанавливающий эффективность Т-клеток – ипилимумаб, моноклональное антитело против CTLA-4 [17].

PD-1 представляет собой трансмембранный белок из семейства В7-CD28, отвечающий за отрицательную регуляцию сигнала от Т-

клеточного рецептора. Оба лиганда данного белка экспрессируются на поверхности антиген-презентирующих клеток, которые оказывает ингибирующее действие посредством рецепторов PD-1 Т-клеток. При связывании запрограммированного лиганда-1 гибели клеток (PD-L1) или PD-L2 происходит блокирование пути PI3K/Akt, что в дальнейшем приводит к подавлению активации Т-клеток. PD-1 – ингибирующий рецептор Т-клеток, который индуцируется после активации Т-клеток.

Его основная функция заключается в том, чтобы действовать как «стоп-сигнал», ограничивая иммунные реакции в периферических тканях, чтобы защитить их от аутоиммунного повреждения. PD-1 может быть индуцирован на других активированных субпопуляциях не-Т-лимфоцитов, включая В-клетки и естественные клетки-киллеры. PD-L1 и PD-L2 являются стимулирующими лигандами для ингибирующего рецептора PD-1. PD-L1 активируется в солидных опухолях, и увеличение степени его экспрессии связано с неблагоприятным прогнозом.

При блокировании оси PD-1/PD-L1 иммуносупрессивная среда меняется на противоположную, и активируется противоопухолевый иммунный ответ. Самыми изученными препаратами – моноклональными антителами, блокирующими PD-1, являются пембролизумаб и ниволумаб [17].

9.5. Основные направления исследований эффективности сочетания ЛТ/ ХЛТ/ ИТ

Основными направлениями исследований эффективности сочетания ЛТ/ХЛТ/ИТ являются:

1. Одновременная ИТ и ХЛТ (Concomitant immunotherapy and chemo-radiotherapy)
2. Замена химиотерапии иммунотерапией (Replacing chemotherapy with immunotherapy)
3. Консолидирующая / поддерживающая иммунотерапия (Consolidation/maintenance immunotherapy trials in stage III NSCLC)

9.6. Клиническое обоснование возможностей сочетания лучевой/химиолучевой и иммунотерапии (ЛТ/ХЛТ/ ИТ) на примере НМРЛ

В РКИ PACIFIC проведен сравнительный анализ консолидирующего назначения ингибитора PD-L1 препарата дурвалумаб против плацебо у пациентов с местнораспространенным неоперабельным НМРЛ III стадии (n=713) после проведенной ЛТ с одномоментной химиотерапией на основе препаратов платины (consolidation durvalumab q2 wks for 1-year vs placebo; ЛТ 54-66 Гр).

В исследовании доказано улучшение в группе иммунотерапии по всем показателям: 2-летняя OS 66% vs 56%; 5-летняя OS 43% vs 33%; медиана OS 47,5 vs 29,1 мес.; медиана DMFS (distant metastasis-free survival) 36,5 vs 17,7 мес; ORR (objective response rate) 30% vs 18%; медиана PFS (progression-free survival) 17,2 vs 5,6 мес.; 1-летняя PFS 56% vs 35% и 5-летняя PFS 33% vs 19%.

Продемонстрировано снижение риска смерти или отдаленных метастазов (TTDM – time to death or distant metastasis) на 41% (stratified HR, 0.59; 95% CI, 0,47 to 0,74). Частота новых поражений составила 24,2% vs 33,3%. Метастазы в головном мозге зафиксированы в 6,5% vs 11,8%. Токсичность 3-4 степени оказалась 30% против 26%. Отмечено улучшение OS при начале иммунотерапии в срок до 14 дней после окончания ЛТ. Благоприятными прогностическими факторами для PFS были азиатская раса и неплоскоклеточная гистологическая структура, а для OS – еще и WHO PS 0 и возраст моложе 65 лет [12, 98].

В публикации N. Shaverdian et al. (2017), посвященной РКИ KEYNOTE-001 при распространенном НМРЛ сочетание иммунотерапии (пембролизумаб) с ЛТ в сравнении с группой только ИТ (n=98) продемонстрировало PFS выше чем в альтернативной группе (HR 0,56 [95% CI 0,34-0,91], p=0,019). Медиана PFS составила 4,4 мес. [95% CI 2,1-8,6] vs 2,1 мес. [1,6-2,3]). OS также была значимо выше (HR 0,58 [95% CI 0,36-0,94], p=0,026). Медиана OS 10,7 мес. [95% CI 6,5-18,9] vs 5,3 мес. [2,7-7,7]. Легочная токсичность была сопоставима – 63% vs 40% [94].

По данным W. Theelen et al. (2019) в многоцентровом РКИ (PEMBRO-RT, фаза 2; n=92) изучалась эффективность ИТ (пембролизумаб) и при распространенном НМРЛ в сочетании со СТЛТ (24

Гр за 3 фракции) и без нее, независимо от статуса лиганда PD-L1. ORR через 12 недель составила 18% против 36% ($p = 0,07$); медиана PFS 1,9 мес. (95% CI, 1,7-6,9) vs 6,6 months (95% CI, 4,0-14,6) (HR, 0,71; 95% CI, 0,42-1,18; $p=0,19$), медиана OS – 7,6 мес. (95% CI, 6,0-13,9) vs 15,9 мес. (95% CI, 7,1 мес.) (HR, 0,66; 95% CI, 0,37-1,18; $P = 0,16$). Констатирована высокая эффективность у пациентов с PD-L1-негативными опухолями в группе лучевой терапии, при этом не отмечено нарастания токсичности [104, 105].

В объединенном анализе 2 РКИ: PEMBRO-RT (фаза 2) + MDACC (фаза 1/2) ($n=148$; Theelen W. et al., 2021) установили, что, медиана PFS была значимо выше в группе ИТ + СТЛТ – 4,4 vs 9,0 мес. (hazard ratio [HR] 0,67, 95% CI 0,45-0,99; $p=0,045$), а медиана OS оказалась 8,7 vs 19,2 мес. ($p=0,0004$) [104, 105].

В крупном исследовании С.С. Foster et al. (2019; $n=44498$), изучавших результаты ЛТ/ ХЛТ/ ИТ при метастатическом НМРЛ на основе данных National Cancer Database, показали, что выживаемость при сочетании облучения и ИТ во всех анализируемых группах была статистически значимо выше (HR:0,81, 95%CI:0,78-0,83; $p=0,89$) [46].

В статье Formenti S.C. et al. (2018) описан радиоиндуцированный ответ на сочетание ЛТ (6,0 или 9,5 Гр) с CTLA-4 блокадой при метастатическом рефрактерном НМРЛ ($n = 39$). Частота объективного ответа (ORR) составила 18%, DCR (disease control rate) – контроль заболевания – 31%, OS 20,4 vs 3,5 месяцев, а PFS 7,1 vs 3,0 месяца. Повышенный уровень интерферона- β после облучения и ранние динамические изменения клонов Т-клеток крови были самыми сильными предикторами ответа [45].

В систематическом обзоре и метаанализе 19 исследований Yin Yang et al. (2022) продемонстрировано, что в группе больных, у которых облучение головного мозга сочеталось с ИТ (ИКТ – Immune checkpoint inhibitors – ICIs) против только ЛТ – совокупный эффект (pooled effect size ES) для OS (HR=0,77; 95%CI 0,71-0,83; $I^2 = 0$; $P<0,001$) и неврологические нежелательные явления 3-4 степени (RR=0,91; 95% CI 0,41-2,02; $I^2 = 26,5$; $P=0,809$) показали значимо более высокую эффективность [125].

N.K. Altorki et al. (2021), провели РКИ ($n=60$; 2 фаза), в котором сравнивали только неоадьювантную монотерапию дурвалумабом (2 цикла с интервалом в 3 недели), против ее сочетания с СТЛТ (8 Гр \times 3 фракции) при раннем НМРЛ. Больным без генерализации выполняли хирургическое лечение. Порог достижения выраженного пато-

логического ответа определен как $\leq 10\%$ жизнеспособных опухолевых клеток в первичной опухоли. Выраженный патологический ответ отмечен у 6,7% [95% CI: 0,8-22,1] группы монотерапии и 53,3% [95% CI: 34,3-71,7] при сочетании с СТЛТ, различия были статистически значимы – (crude odds ratio – 16,0 [95% CI: 3,2-79,6]; $p < 0,0001$). В группе двойной терапии у 8 пациентов (50%) патологический ответ был полным. Частота нежелательных явлений 3-4 степени составила 17% vs 20% [11].

Изучаются и возможности сочетания блокаторов других контрольных точек с ЛТ: РКИ START (темцетотид), STOR изучалась (белагенпуматуксель-L), исследования с теломеразным пептидом GV1001 и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (гм-КСФ) [78].

9.7. Нерешенные вопросы комбинации лучевой терапии и иммунотерапии

1. Не определена оптимальная последовательность и сроки проведения комбинации ЛТ/ХЛТ и иммунотерапии (ИТ).
2. Предстоит оптимизировать объем и режим проведения ЛТ/ХЛТ/ИТ – величину полей, дозы, фракционирование.
3. Не доказана предпочтительность конкурентной (синхронной) и последовательной (консолидирующей) тактики ЛТ/ХЛТ/ИТ.
4. До конца не изучена взаимосвязь морфологических (в том числе иммуногистохимических и молекулярно-генетических) характеристик опухолей с эффективностью ЛТ/ХЛТ/ИТ.
5. Необходимо определить наиболее целесообразные объём, количество и локализацию облучаемых очагов при ЛТ/ХЛТ/ИТ метастатических форм опухолей.
6. Не установлена взаимосвязь эффективности ЛТ/ХЛТ/ИТ и уровень экспрессии различных рецепторов и их лигандов (например, PD-1, PD-L1, B7-1, B7-2, CD28 и т.п.), а также возможность изменения их экспрессии в процессе лечения.
7. Предстоит исследовать влияние конкурентного и консолидирующего режимов лечения на усиление токсичности, в том числе легочной.
8. Не определен в достаточной степени потенциал ЛТ/ХЛТ/ ИТ в отношении процессов иммуномодуляции, в частности, эффекта иммуносупрессии.

9. Необходимо создание единой комплексной модели, объединяющей линейно-квадратичную, сосудистую, иммунную и неиммунную, которая максимально адекватно будет отражать все механизмы реализации эффекта лучевой терапии (особенно высокодозного облучения), химиолучевой терапии и иммунотерапии.

Глава 10.

Комплексная радиобиологическая модель

Таким образом, опухолевый ответ на ионизирующее излучение реализуется посредством нескольких механизмов:

- 1) прямое цитотоксическое повреждение опухолевых клеток, вызванное повреждением ДНК, которое происходит как при низких, так и при высоких дозах на фракцию;
- 2) непрямая гибель опухолевых клеток, которой предшествует повреждение сосудов и эндотелиальных клеток, преимущественно при высоких дозах за фракцию;
- 3) непрямая гибель опухолевых клеток за счет подключения иммунных механизмов;
- 4) реализация немишенных механизмов смешанного генеза.

При высоких дозах облучения преобладает непрямая гибель опухолевых клеток, возникающая в результате ишемии после летального повреждения эндотелиальных клеток и разрушения микрососудов, что обеспечивает немедленную тяжелую сосудистую реакцию и последующее подключение иммунного ответа.

В широкой трактовке на современном этапе описание основных понятий и постулатов радиационной биологии можно свести к нескольким моделям.

1. Линейно-квадратичная модель (linear-quadratic model – LQ) выживания клеток и ее модифицированные варианты

- проблемы изоэффекта;
- соотношение α/β ;
- биологически эффективные дозы (Biologically Effective Doses – BEDs);
- терапевтический индекс (терапевтическое отношение).

2. Сосудистая модель

- опухолевый ангиогенез;
- сосудистая сеть опухоли и радиочувствительность;
- повреждение сосудов и сосудистый коллапс;

- усиление сосудистой реакции с использованием комбинированного лечения (модификация, в основном угнетение, ангиогенез лекарственными препаратами, например, ингибиторы VEGF/bFGF).

3. Радиоиммунобиологическая модель

- Усиленная облучением презентация антигенов (radiation-enhanced antigen presentation – REAP).
- Индуцированные облучением DAMP сигналы, ассоциированные с клеточным повреждением (Radiation-Induced DAMP Signals).
- Индуцированная облучением вирусная мимикрия (Radiation-Induced Viral Mimicry).
- Иммуносупрессивные эффекты лучевой терапии (Immunosuppressive Properties of RT).
- Уход опухоли от иммунного ответа и радиорезистентность (Immune Evasion by Tumors and Radioresistance).
- Облучение, как иммуномодулирующее средство, характер которого определяется дозой и фракционированием (Radiation as an Immunomodulatory Drug: Effect of Dose and Fractionation of RT):
 - ✓ иммуноаблятивное облучение – высокие дозы (Immunoblative RT – IART).
 - ✓ иммуномодулирующее облучение – средневысокие дозы (Immunomodulatory RT – IMRT).
 - ✓ облучение, модулирующее микроокружение опухоли (tumor microenvironment – TME) – низкие дозы, классическое фракционирование (Tumor Microenvironment Modulating RT – TME-M-RT).

4. Модель немишеных эффектов (описывается на стыке трех основных моделей радиобиологии: линейно-квадратичной, сосудистой и иммунной).

- Радиационно-индуцированная геномная нестабильность.
- Абскопальный эффект и его частный случай – «эффект свидетеля».
- Радиационный гормезис.
- Адаптивный ответ.
- Начальная гиперчувствительность.
- Индуцированная радиорезистентность.

Каждая из этих моделей описывает свое звено совокупного ответа опухоли и нормальных тканей на проводимое облучение.

Очевидно, что назрела необходимость создания единой комплексной модели, объединяющей все предыдущие и максимально адекватно отражающей все механизмы реализации эффекта лучевой терапии, особенно высокодозного облучения.

Контрольные вопросы

1. Предмет изучения радиобиологии.
2. Фазы воздействия ионизирующего излучения на биологические объекты.
3. Мишенные и немишенные радиобиологические эффекты.
4. Детерминированные мишенные радиобиологические эффекты.
5. Стохастические немишенные радиобиологические эффекты.
6. Абскопальный эффект, «эффект свидетеля» («bystander-effect»).
7. Этапы развития радиобиологии, радиационной онкологии и технологий облучения.
8. Эволюция технологии облучения. Технологические этапы становления лучевой терапии.
9. Зависимость эффекта лучевой терапии от дозы облучения.
10. Стереотаксическая лучевая терапия. Определение. Основные характеристики методики.
11. История развития радиохирургии и стереотаксической лучевой терапии.
12. Сравнительная характеристика методик стереотаксической лучевой терапии.
13. СТЛТ на линейном ускорителе. Характеристика метода.
14. Терапевтический индекс (терапевтическое отношение).
15. Параллельные и последовательные органы.
16. Принципы 4R/5R – репарация (repair), реоксигенация (reoxygenation), перераспределение (redistribution), репопуляция (repopulation) радиочувствительность (radiosensitivity).
17. Модели выживания клеток и проблемы изоэффекта.
18. Линейно-квадратичная модель и линейно-квадратичное уравнение.
19. Соотношение α/β .
20. Биологически эффективные дозы.
21. Модифицированные линейно-квадратичные модели при высокодозном облучении.
22. Роль сосудистых механизмов в реализации эффектов высокодозного облучения.
23. Характеристики сосудистой сети и кровотока опухоли.

24. Модификация сосудистого ответа на облучение при комбинированном лечении.
25. Основные феномены модификации иммунного ответа на облучение.
26. Усиленная облучением презентация антигенов.
27. Индуцированные облучением DAMP сигналы, ассоциированные с клеточным повреждением.
28. Индуцированная облучением вирусная мимикрия.
29. Иммуносупрессивные эффекты лучевой терапии.
30. Уход опухоли (адаптивное уклонение) от иммунного ответа и радиорезистентность.
31. Иммуномодулирующие свойства лучевой терапии и их связь с дозами и фракционированием.
32. Иммунооблятивное облучение при использовании высоких доз.
33. Иммуномодулирующая ЛТ при применении средневысоких доз.
34. Облучение, модулирующее микроокружение опухоли при использовании низких доз.
35. Характеристика абскопального эффекта и «эффекта свидетеля» («bystander-effect»).
36. Алгоритмы возможных сочетаний облучения с системным лечением (химиотерапией и иммунотерапией).
37. Классификация микроокружения опухоли (ТМЕ): иммунологически «горячие» и «холодные» опухоли.
38. Лучевая терапия и иммунные контрольные точки.
39. Нерешенные вопросы комбинации лучевой терапии и иммунотерапии.
40. Разработка комплексной радиобиологической модели.

Тестовые задания

Инструкция: выберите один или несколько правильных ответов

1. К ионизирующим излучениям относятся:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	квантовое (фотонное) и корпускулярное	+
б	световое (видимая часть спектра)	
в	лазерное	
г	ультрафиолетовое	
д	инфракрасное	

2. Тормозное рентгеновское излучение – это:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	γ -излучение некоторых радионуклидов	
б	поток электронов, получаемых в ускорителях	
в	излучение, возникшее при торможении ускоренных электронов на мишени	+
г	излучение, возникшее при изменении энергетического состояния атома	
д	эмиссия электронов с катода рентгеновской трубки	

3. Фазы воздействия ионизирующего излучения на биологические объекты:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	физическая	+
б	математическая	
в	химическая	+
г	биологическая	+

4. Мишенные радиобиологические эффекты:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	стохастические	+
б	детерминированные	+
в	экзистенциальные	
г	абскопальные	

5. К параллельным органам относятся:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	легкие	+
б	пищевод	
в	печень	+
г	кишечник	

6. К принципам 4R относятся:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	репарация (repair)	+
б	реоксигенация (reoxygenation)	+
в	реверберация (reverberation)	
г	перераспределение (redistribution)	+
д	репопуляция (repopulation)	+

7. С электронами атомов взаимодействуют следующие виды ионизирующих излучений:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	отрицательные π^- -мезоны и нейтроны	
б	электроны	+
в	протоны	+
г	фотоны	+

8. Поглощенная доза – это энергия:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	поглощенная в 1 см ³ вещества	
б	поглощенная в единице массы облученного объема	+
в	поглощенная во всей массе облученного объема	
г	поглощенная в единице массы за единицу времени	
д	переданная веществу фотоном или частицей на единице длины их пробега	

9. Активность радионуклида – это:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	число радиоактивных ядер	
б	скорость распада радиоактивных ядер	+
в	число распадов в единицу времени	+
г	число радиоактивных ядер в 1 мг радиоактивного вещества	

10. Единицами измерения активности являются:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	Кюри (Ку)	+
б	Беккерель (Бк)	+
в	с^{-1} (секунда)	+
г	мг-эквивалент Ra	

11. Определение экспозиционной дозы связано с эффектами:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	ионизации воздуха под действием излучения	+
б	химического действия излучения	
в	теплового действия излучения	
г	световозбуждающего действия излучения	
д	повышения электропроводности под действием излучения	

12. Единицами измерения экспозиционной дозы являются:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	Рентген (Р, Rg)	+
б	Кулон/кг	+
в	Грей	
г	Рад	

13. Радионуклидные источники для дистанционной лучевой терапии:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	кобальт-60	+
б	калифорний-252	
в	цезий-136	+
г	иридий-192	

14. К закрытым радионуклидным источникам для контактной лучевой терапии относятся все, кроме:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	цезия-137	
б	фосфора-32	+
в	кобальта-60	
г	иридия-192	
д	калифорния-252	

15. Относительная глубинная доза γ -излучения – это:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	доза излучения на некоторой глубине в облучаемом теле	
б	отношение дозы излучения на некоторой глубине в теле к дозе на ее поверхности	
в	отношение дозы излучения на некоторой глубине к дозе в максимуме ионизации	+
г	отношение дозы излучения на некоторой глубине в теле к дозе на глубине 15 см	+

16. Карта изодоз дистанционного пучка γ -излучения – это:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	распределение процентных глубинных доз по всему сечению пучка излучения, лежащему в плоскости центрального луча	+
б	распределение процентных глубинных доз по центральному лучу пучка	
в	распределение процентных глубинных доз по любому сечению пучка излучения	+
г	суммарное распределение процентных глубинных доз в поперечном сечении при многопольном статическом облучении	

17. Отношение «ткань-воздух» применяется для:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	учета влияния легочной ткани на величину глубинной дозы	
б	расчета мощности дозы в центре пересечения осей пучков при многопольном статическом облучении	+
в	учета недостатка рассеянного излучения при использовании защитных блоков	+
г	расчета мощности дозы в центре вращения при подвижном облучении	

18. Основные механизмы физического взаимодействия ионизирующих излучений с веществом:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	ионизация молекул	+
б	передача заряда	
в	возбуждение молекул	+
г	гидролиз воды	

19. К видам радиохимических реакций относятся:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	спонтанная диссоциация	+
б	спонтанная диссоциация	+
в	реакция с отрицательным ионом	+
г	реакция с нейтральной молекулой	+

20. Неоангиогенез осуществляется путем:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	активации эндотелиальных клеток основными факторами роста фибробластов (bFGF) и факторами роста эндотелия сосудов (VEGF)	+
б	посредством пролиферации и инвазии эндотелиальных клеток в окружающий матрикс	+
в	инвагинацией ангиогенеза	+
г	дубликацией митохондрий	
д	васкулогенной мимикрией	+

21. Высокую степень радиочувствительности имеют все перечисленные органы и ткани, кроме:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	лимфоидной ткани	
б	кожи	+
в	тимуса	
г	костного мозга	
д	яичек и яичников	

22. Среднюю степень радиочувствительности имеют все перечисленные органы и ткани, кроме:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	кожи	
б	слизистых оболочек полости рта	
в	слизистой оболочки пищевода	
г	слизистой оболочки мочевого пузыря	
д	мышечной ткани	+

23. Радиорезистентными являются все перечисленные органы и ткани, кроме:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	тонкого кишечника	+
б	печени	
в	глии	
г	мышечной ткани	
д	костной ткани у взрослых	

24. Высокой радиочувствительностью обладают все перечисленные опухоли, кроме:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	лимфоэпителиом	
б	семинол	
в	плоскоклеточного рака кожи	+
г	базалиом	
д	опухоли Вильмса	

25. Опухолевая клетка чувствительна к ионизирующему излучению в фазах клеточного цикла, кроме:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	фазы митоза (m)	
б	пресинтетической фазы (S ¹)	
в	фазы синтеза (S)	+
г	постсинтетической фазы (S ²)	

26. Основные модели радиобиологии:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	линейно-квадратичная модель	+
б	сосудистая модель	+
в	нейроэндокринная	
г	радиоиммунобиологическая	+
д	модель немишеннных эффектов	+

Список литературы

1. Арсеньев А.И., Новиков С.Н., Канаев С.В., Барчук А.А., Антипов Ф.Е., Зозуля А.Ю., Мельник Ю.С., Гагуа К.Э., Нефедов А.О., Тарков С.А., Аристидов Н. Ю. Перспективы использования стереотаксической лучевой терапии при первичных и олигометастатических опухолевых поражениях лёгких // Вопросы онкологии – 2021. – № 3 (67). – С. 323-331. DOI: 10.37469/0507-3758-2021-67-3-323-331.
2. Борщеговская П.Ю., Розанов В.В., Студеникин Ф.Р. Взаимодействие ионизирующего излучения с веществом: учебное пособие – Москва: МГУ, 2019. – 78 с.
3. Джойнер М.С., ван дер Когель О.Дж. Основы клинической радиобиологии: пер. с англ. – Москва: БИНОМ – Лаборатория знаний, 2013. – 600 с.
4. Климанов В.А. Радиобиологическое и дозиметрическое планирование лучевой и радионуклидной терапии. Часть 1. Радиобиологические основы лучевой терапии. Радиобиологическое и дозиметрическое планирование дистанционной лучевой терапии пучками тормозного и гамма-излучения и электронами: учебное пособие. – Москва: НИЯУ МИФИ, 2011. – 500 с.
5. Котеров А.Н. Перспективы учета «эффекта свидетеля» при оценке радиационных рисков // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2011. – № 1(5). – С. 7-19.
6. Литтл Д.Б. Немишенные эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2007. – № 47(3). – С. 262-272.
7. Пелевина И.И., Петушкова В.В., Бирюков В.А., Аклеев А.В., Нейфах Е.А., Минаева Н.Г., Ктиторова О.В., Алещенко А.В., Плешакова Р.И. Роль «немишенных эффектов» в реакции клеток человека на радиационное воздействие // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2019. – № 59(3). – С. 261-273.
8. Смирнова М.В. Механизмы, роли и перспективы учета эффекта свидетеля в радиобиологии и медицине // Естественные и технические науки. – 2019. – № 6. – С. 159-164.
9. Смоленов Е.И., Афонин Г.В., Усачев В.С., Кудрявцев Д.Д., Колобаев И.В., Иванов С.А. Возможности сочетания иммунотерапии с лучевой терапией в лечении больных неоперабельным местно-

распространенным немелкоклеточным раком легкого // Исследования и практика в медицине. – 2021. – Т. 8, № 2. – С. 109-123. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2021-8-2-10>.

10. Столбовой А.В., Залялов И.Ф. Радиобиологические модели и клиническая радиационная онкология // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2016. – Т. 6. – С. 88-96. doi: 10.17116/onkolog20165688-96.

11. Altorki N.K. et al. Neoadjuvant durvalumab with or without stereotactic body radiotherapy in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a single-centre, randomised phase 2 trial // *Lancet Oncol.* – 2021. – Vol. 22, № 6. – P. 824-835. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00149-2.

12. Aupérin A, Pécoux CL, Rolland E, et al. Meta- Analysis of Concomitant Versus Sequential Radiochemotherapy in Locally Advanced Non- Small-Cell Lung Cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 2181-90. DOI: <https://doi.org/10.1200/ICO.2009.26.2543>

13. Ballarini F. From DNA radiation damage to cell death: theoretical approaches // *J. Nucleic Acids.* – 2010. – 2010:350608. – doi:10.4061/2010/350608.

14. Bao S., Wu Q., McLendon R.E. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response // *Nature.* – 2006. – Vol. 444. – P. 756-760.

15. Beyzadeoglu M., Ozyigit G., Ebruli C. Basic Radiation Oncology / Springer, Berlin, Heidelberg. – 2020. – 575 p. DOI <https://doi.org/10.1007/978-3-642-11666-7>.

16. Bergonié J., Tribondeau L. Interpretation de quelques resultats de la radiotherapie // *C. R. Acad. Sci.* – 1906. – Vol. 143. – P. 983-988.

17. Bhatta N., Brooker R., Brada M. Combining immunotherapy and radiotherapy in lung cancer // *J. Thorac. Dis.* – 2018. – Vol. 10(13). – S1447-S1460. doi: 10.21037/jtd.2018.05.107.

18. Brown J.M. Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation // *Br. J. Radiol.* – 1979. – Vol. 52. – P. 650-656.

19. Brown J.M., Diehn M., Loo B.W. Stereotactic ablative radiotherapy should be combined with a hypoxic cell radiosensitizer // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2010. – Vol. 78, № 2. – P. 323-327.

20. Brown J.M., Carlson D.J., Brenner D.J. The tumor radiobiology of SRS and SBRT: are more than the 5 Rs involved? // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2014. – Vol. 88(2). – P. 254-262.

21. Brown J.M., Carlson D.J., Brenner D.J. Dose escalation, not «new biology», can account for the efficacy of stereotactic body radiation therapy with non-small cell lung cancer. In reply to Rao et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2014. – Vol. 89(3). – P. 693-694.

22. Chadha A.S., Liu G., Chen H.C. et al. Does unintentional splenic radiation predict outcomes after pancreatic cancer radiation therapy? // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2017. – Vol. 97, № 2. – P. 323-332.

23. Chadwick K.H., Leenhouts H.P. The molecular theory of radiation biology // Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1981. – 394 p.

24. Chan N., Koritzinsky M., Zhao H. et al. Chronic hypoxia decreases synthesis of homologous recombination proteins to offset chemoresistance and radioresistance // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – P. 605-614.

25. Chen D.S., Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle // *Immunity.* – 2013. – Vol. 39, № 1. – P. 1-10.

26. Corrales L., McWhirter S.M., Dubensky T.W. Jr., Gajewski T.F. The host STING pathway at the interface of cancer and immunity // *J. Clin. Invest.* – 2016. – Vol. 126(7). – P. 2404-2411.

27. Coutard H. Roentgen therapy of epitheliomas of the tonsillar region, hypopharynx and larynx from 1920 to 1926 // *Am. J. Roentgenol.* – 1932. – Vol. 28. – P. 313-331.

28. Coutard H. Principles of x ray therapy of malignant disease // *Lancet.* – 1934. – Vol. 224. – P. 1-8. doi: 10.1016/S0140-6736(00)90085-0.

29. Curtis S.B. Track structure in biological models // *Adv. Space Res.* – 1986. – Vol. 6(11). – P. 179-185. doi: 10.1016/0273-1177(86)90290-5.

30. Deacon J., Peckham M.J., Steel G.G. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve // *Radiother. Oncol.* – 1984. – Vol. 2(4). – P. 317-323.

31. Demaria S., Ng B., Devitt M.L. et al. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2004. – Vol. 58. – P. 862-870.

32. Demaria S., Golden E.B., Formenti S.C. Role of local radiation therapy in cancer immunotherapy // *JAMA Oncol.* – 2015. – Vol. 1(9). – P. 1325-1332.
33. Denekamp J. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours // *Acta Radiol. Oncol.* – 1984. – Vol. 23. – P. 217-225.
34. Dewan M.Z., Galloway A.E., Kawashima N., Dewyngaert J.K., Babb J.S., Formenti S.C., Demaria S. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15(17). – P. 5379-5388.
35. Dillman R.O., Herndon J., Seagren S.L., Eaton W.L. Jr., Green M.R. Improved Survival in Stage III Non- Small-Cell Lung Cancer: Seven-Year Follow-up of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 8433 Trial // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 1996. – Vol. 88. – P. 1210-1215. doi.org/10.1093/inci/88.17.1210
36. Douglas B.G., Fowler J.F. The effect of multiple small doses of X-rays on skin reactions in the mouse and a basic interpretation // *Radiat. Res.* – 1976. – Vol. 66. – P. 401-426.
37. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape // *Nat. Immunol.* – 2002. – Vol. 3(11). – P. 991-998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>.
38. El-Awady R.A., Dikomey E., Dahm-Daphi J. Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks // *Br. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 89(3). – P. 593-601.
39. Ellis F. Dose, time and fractionation: a clinical hypothesis // *Clin. Radiol.* – 1969. – Vol. 20. – P. 1-8.
40. Emami B., Lyman J., Brown A. et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1991. – Vol. 21(1). – P. 109-122. doi: 10.1016/0360-3016(91)90171-y.
41. Fan Y., Paliwal B. Analyzing the fractionation and dose-rate effect in radiotherapy with kinetic cell killing model (WIP) // *AAPM.* – 2003. – Meeting (San Diego, CA).
42. Fang P., Shiraishi Y., Verma V. et al. Lymphocyte-sparing effect of proton therapy in patients with esophageal cancer treated with definitive chemoradiation // *Int. J. Part. Ther.* – 2018. – Vol. 4, № 3. – P. 23-32.

43. Favaudon V., Caplier L., Monceau V. et al. Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – Vol. 6, № 245. – 245-293.
44. Folkman J, Judah F. Tumor angiogenesis: therapeutic implications // *N. Engl. J. Med.* – 1971. – Vol. 285, № 21. – P. 1182-1186.
45. Formenti S.C., Rudqvist N-P., Golden E. et al. Radiotherapy induces responses of lung cancer to CTLA-4 blockade // *Nature Medicine.* – 2018. – Vol. 24. – P. 1845-1851. doi: 10.1038/s41591-018-0232-2.
46. Foster C.C., Sher D.J., Rusthoven C.G. et al. Overall survival according to immunotherapy and radiation treatment for metastatic non-small-cell lung cancer: a National Cancer Database analysis // *Radiation Oncology.* – 2019. – Cite this article <https://rojournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13014-019-1222-3>
47. Fuks Z., Kolesnick R. Engaging the vascular component of the tumor response // *Cancer Cell.* – 2005. – Vol. 8. – P. 89-91. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.07.014>.
48. Gameiro S. R., Jammeh M. L., Wattenberg M. M., Tsang K. Y., Ferrone S., Hodge J.W. Radiation-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killing // *Oncotarget.* – 2014. – Vol. 5, № 2. – P. 403-416.
49. Garcia-Barros M., Paris F., Cordon-Cardo C. et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis // *Science.* – 2003. – Vol. 300(5622). – P. 1155-1159.
50. García-Barros M., Thin T.H., Maj J. et al. Impact of stromal sensitivity on radiation response of tumors implanted in SCID hosts revisited // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70(20). – P. 8179-8186.
51. Golden E.B., Frances D., Pellicciotta I. et al. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death // *Oncoimmunology.* – 2014. – Vol. 3. – P. e28518.
52. Gorchs L., Hellevik T., Bruun J.-A. et al. Cancer-associated fibroblasts from lung tumors maintain their immunosuppressive abilities after high-dose irradiation // *Front Oncol.* – 2015. – Vol. 5. – P. 87.
53. Gough M.J., Crittenden M.R., Young K.H. Comparing equals when evaluating immunotherapy with different doses and fractions of radiation therapy // *Immunotherapy.* – 2015. – Vol. 7(8). – P. 847-849.

54. Guerrero M., Li X.A. Extending the linear-quadratic model for large fraction doses pertinent to stereotactic radiotherapy // *Phys. Med. Biol.* – 2004. – Vol. 49. – P. 4825-4835. 10.1088/0031-9155/49/20/012.
55. Czarnota G.J. Ultrasound-stimulated microbubble enhancement of radiation response // *Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 396(6-7). – P. 645-657.
56. Harding S.M., Benci J.L., Irianto J. et al. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei // *Nature.* – 2017. – Vol. 548(7668). – P. 466-470.
57. Heninger E., Krueger T.E., Lang J.M. Augmenting antitumor immune responses with epigenetic modifying agents // *Front Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 29.
58. Hillen F., Griffioen A.W. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond // *Cancer Metastasis Rev.* – 2007. – Vol. 26(3-4). – P. 489-502.
59. Hockel M., Schlenger K., Aral B. et al. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix // *Cancer Res.* – 1996. – Vol. 56. – P. 4509-4515.
60. Joiner M.C., Kogel A.J. *Basic Clinical Radiobiology.* – 2018. – Taylor & Francis Group. – Ed. 5th. – 360 p. DOI<https://doi.org/10.1201/9780429490606>
61. Joyce J.A., Fearon D.T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment // *Science.* – 2015. – Vol. 348(6230). – P. 74-80.
62. Kaidar-Person O., Chen R. *Hypofractionated and Stereotactic Radiation Therapy. A Practical Guide / Zeman E.M. The History and Radiobiology of Hypofractionation // Springer International Publishing AG.* – 2018. – P. 1-32.
63. Kirkpatrick J.P., Soltys S.G., Lo S.S. et al. The radiosurgery fractionation quandary: single fraction or hypofractionation? // *Neuro-Oncology.* – 2017. – Vol. 19(2). – P. 38-49.
64. Kleibeuker E.A., Griffioen A.W., Verheul H.M. et al. Combining angiogenesis inhibition and radiotherapy: a double-edged sword // *Drug Resist. Updat.* – 2012. – Vol. 15(3). – P. 173-82.
65. Klug F., Prakash H., Huber P.E. et al. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS(+)/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy // *Cancer Cell.* – 2013. – Vol. 24(5). – P. 58-602.

66. Kocher M., Treuer H., Voges J. et al. Computer simulation of cytotoxic and vascular effects of radiosurgery in solid and necrotic brain metastases // *Radiother Oncol.* – 2000. – Vol. 54, № 2. – P. 149-156.
67. Krock B.L., Skuli N., Simon M.C. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil // *Genes Cancer.* – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 1117-1133.
68. Kumar K.A., Peck K.K., Karimi S. et al. A pilot study evaluating the use of dynamic contrast-enhanced perfusion MRI to predict local recurrence after radiosurgery on spinal metastases // *Technol. Cancer Res. Treat.* – 2017. – Vol. 16(6). – P. 857-865.
69. Lauber K., Ernst A., Orth M. et al. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy // *Front Oncol.* – 2012. – Vol. 2. – P. 116.
70. Lea D.E., Catcheside D.G. The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia* // *J. Genet.* – 1942. – Vol. 44. – P. 216-245.
71. Leskel L. The stereotactic method and radiosurgery of the brain // *Acta Chir. Scand.* – 1951. – Vol. 102. – P. 316-319.
72. Luckey T.D. *Hormesis with Ionizing Radiation.* – Tokyo: Boca Raton Publisher, CRC Press, 1980. – 222 p.
73. Michalowski A.S. Post-irradiation modification of normal-tissue injury: lessons from the clinic // *B. J. R.* – 1992. – Vol. 24. – P. 183-186.
74. Ministro A., de Oliveira P., Nunes R.J. et al. Low-dose ionizing radiation induces therapeutic neovascularization in a pre-clinical model of hindlimb ischemia // *Cardiovasc Res.* – 2017. – Vol. 113(7). – P. 783-794.
75. Minn A.J., Wherry E.J. Combination cancer therapies with immune checkpoint blockade: convergence on interferon signaling // *Cell.* – 2016. – Vol. 165(2). – P. 272-275.
76. Mottram J.C. A factor of importance in the radio sensitivity of tumours // *Br. J. Radiol.* – 1936. – Vol. 9(105). – P. 606-614.
77. Morris Z.S., Guy E.I., Werner L.R. et al. Tumor-specific inhibition of in situ vaccination by distant untreated tumor sites // *Cancer Immunol. Res.* – 2018. – Vol. 6(7). – P. 825-834.
78. Muto M., Sgambato A., Maione P., Spagnuolo A., Gridelli C. Locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): The potential role

of concurrent immunotherapy and radiotherapy // *J. Transl. Sci.* – 2021. – Vol. 7. – P. 1-9. doi: 10.15761/JTS.1000437.

79. Niemierko A. Reporting and analyzing dose distributions: a concept of equivalent uniform dose // *Med. Phys.* – 1997. – Vol. 24(1). – P. 103-110.

80. Onishi H., Araki T., Shirato H. et al. Stereotactic hypofractionated high-dose irradiation for stage I nonsmall cell lung carcinoma: Clinical outcomes in 245 subjects in a Japanese multiinstitutional study // *Cancer.* – 2004. – Vol. 101. – P. 1623-1631.

81. Orton C., Ellis F. A simplification in the use of the NSD concept in practical radiotherapy // *Br. J. Radiol.* – 1973. – Vol. 46(547). – P. 529-537. doi:10.1259/0007-1285-46-547-529.

82. Orton C. Errors in applying the NSD concept // *Radiology.* – 1975. – Vol. 115(1). – P. 233-235. doi:10.1148/115.1.233.

83. Park C., Papiez L., Zhang S., Story M., Timmerman R.D. Universal survival curve and single fraction equivalent dose: useful tools in understanding potency of ablative radiotherapy // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2008. – Vol. 70. – P. 847-852.

84. Park H.J., Griffin R.J, Hui S., Levitt S.H., Song C.W. Radiation-induced vascular damage in tumors: implications of vascular damage in Ablative Hypofractionated Radiotherapy (SBRT and SRS) / *Radiat. Res.* – 2012. – Vol. 177(3). – P. 311-327.

85. Parsons W.B. et al. Changes in stemal bone marrow following roentgen-ray therapy to the spleen in chronic granulocytic leukaemia // *Cancer.* – 1954. – Vol. 7(1). – P. 179-189.

86. Price J.G., Idoyaga J., Salmon H. et al. CDKN1A regulates Langerhans cell survival and promotes Treg cell generation upon exposure to ionizing irradiation // *Nat. Immunol.* – 2015. – Vol. 16(10). – P. 1060-1068.

87. Qiu B., Aili A., Xue L., Jiang P., Wang J. Advances in Radiobiology of Stereotactic Ablative Radiotherapy // *Front Oncol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 1165. doi: 10.3389/fonc.2020.01165.

88. Reissfelder C., Timke C., Schmitz-Winnenthal H. et al. A randomized controlled trial to investigate the influence of low dose radiotherapy on immune stimulatory effects in liver metastases of colorectal cancer // *BMC Cancer.* – 2011. – 11. P. 419.

89. Reddy S.B., Williamson S.K. Tirapazamine: a novel agent targeting hypoxic tumor cells // *Expert Opin. Investig. Drugs.* – 2009. – Vol. 18. – P. 77-87.

90. Rischin D., Peters L.J., O’Sullivan B. et al. Tirapazamine, cisplatin, and radiation versus cisplatin and radiation for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (TROG 02.02, HeadSTART): a phase III trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 2989-2995.

91. Ronden M.I., Palma D., Slotman B.J., Senan S. Brief Report on Radiological Changes following Stereotactic Ablative Radiotherapy (SABR) for Early-Stage Lung Tumors: A Pictorial Essay // *Journal of Thoracic Oncology.* – 2018. – Vol. 13(6). – P. 855-862.

92. Rubin P., Casarett G.W. Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy // *Cancer.* – 1968. – Vol. 22, № 4. – P. 767-778.

93. Sethi R.A., Barani I.J., Larson D.A., Roach M. Handbook of Evidence-Based Stereotactic Radiosurgery and Stereotactic Body Radiotherapy / Vaughan A., Rao S.S.D. // *Radiobiology of Stereotactic Radiosurgery and Stereotactic Body Radiotherapy* – 2016. – Springer. – P. 11-19. DOI 10.1007/978-3-319-21897-7.

94. Shaverdian N., Lisberg A.E., Bornazyan K. et al. Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of non-small-cell lung cancer: a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial // *Lancet Oncol.* – 2017. – Vol. 18(7). – P. 895-903. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30380-7.

95. Shin D.S., Zaretsky J.M., Escuin-Ordinas H. et al. Primary resistance to PD-1 blockade mediated by JAK1/2 mutations // *Cancer Discov.* – 2017. – Vol. 7(2). – P. 188-201.

96. Song C.W., Levitt S.H. Vascular changes in Walker 256 carcinoma of rats following X irradiation // *Radiology.* – 1971. – Vol. 100(2). – P. 397-407.

97. Song C.W., Park H.J., Griffin R.J., Levitt S.H. Radiobiology of stereotactic radiosurgery and stereotactic body radiation therapy. In: Levitt S.H., Purdy J.A., Perez C.A., Poortmans P., editors. *Technical basis of radiation therapy: practical clinical applications.* 5th ed. – Heidelberg: Springer, 2012. – P. 51-61.

98. Spigel D.R., Faivre-Finn C., Gray J.E. et al. Five-Year Survival Outcomes From the PACIFIC Trial: Durvalumab After Chemoradio-

therapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2022. – Vol. 40(12). – P. 1301-1311. doi: 10.1200/JCO.21.01308.

99. Spranger S., Gajewski T.F. Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses // *Nat. Rev. Cancer.* – 2018. – Vol. 18(3). – P. 139-147.

100. Strandqvist M. Studien über die kumulative Wirkung der Roentgenstrahlen bei Fraktionierung // *Acta Radiol. Suppl.* – 1944. – Vol. 55. P. 1-300.

101. Steel G.G., McMillan T.J., Peacock J.H. The 5Rs of Radiobiology // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1989. – Vol. 56. – P. 1045-1048. doi: 10.1080/09553008914552491.

102. Teng M.W., Ngiow S.F., Ribas A., Smyth M.J. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1 // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75(11). – P. 2139-2145.

103. Thames H.D., Withers H.R., Peters L.J. Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation: implications for dose-survival relationships // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1982. – Vol. 8. – P. 219-226.

104. Theelen W.S.M.E., Peulen H.M., Lalezari F. et al. Effect of Pembrolizumab After Stereotactic Body Radiotherapy vs Pembrolizumab Alone on Tumor Response in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Results of the PEMBRO-RT Phase 2 Randomized Clinical Trial // *JAMA Oncol.* – 2019. – Vol. 5(9). – P. 1276-1282. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.1478.

105. Theelen W.S.M.E., Chen D., Verma V. et al. Pembrolizumab with or without radiotherapy for metastatic non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of two randomised trials // *The Lancet. Respiratory Medicine.* – 2021. – Vol. 9(5). – P. 467-475

106. Thomlinson R.H., Gray L.H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy // *Br. J. Cancer.* – 1955. – Vol. 9. – P. 539-549.

107. Trifiletti D.M., Chao S.T., Sahgal A., Sheehan J.P. Stereotactic Radiosurgery and Stereotactic Body Radiation Therapy. – Springer Nature Switzerland AG, 2019. – 435 p.

108. Trifiletti D.M., Chao S.T., Sahgal A., Sheehan J.P. Stereotactic Radiosurgery and Stereotactic Body Radiation Therapy / Springer Nature Switzerland AG. - 2019. – 435 p. / Farhat G., Sharma D., Czarnota G.J.

Vascular-Mediated Mechanisms and SRS/SBRT // Springer Nature Switzerland AG. – 2019. – P. 3-13.

109. Trifiletti D.M., Chao S.T., Sahgal A., Sheehan J.P. Stereotactic Radiosurgery и Stereotactic Body Radiation Therapy / Springer Nature Switzerland AG. - 2019. – 435 p. / Tanksley J., Salama J.K., Kirkpatrick J.P. Rationale for Fractionated SRS и Single SRS Session Approaches // Springer Nature Switzerland AG. – 2019. – P. 31-40.

110. Trifiletti D.M., Chao S.T., Sahgal A., Sheehan J.P. Stereotactic Radiosurgery and Stereotactic Body Radiation Therapy / Springer Nature Switzerland AG. - 2019. – 435 p. / Savage T., Guha C. Radio-Immunology of Ablative Radiation // Springer Nature Switzerland AG. – 2019. – P. 15-29.

111. Truman J.P., García-Barros M., Kaag M. et al. Endothelial membrane remodeling is obligate for anti-angiogenic radiosensitization during tumor radiosurgery // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, № 8. – P. 12310.

112. Tsujii H., Kamada T., Shirai T., Noda K., Tsuji H., Karasawa K. Carbo-ion radiotherapy. – Tokyo, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer; 2014. – 284 p. – ISBN 9784431544562.

113. United Nations. UNSCEAR 2006. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Annex C. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation // United Nations. – New York. – 2009. – P. 1-79.

114. Valdiglesias V., Giunta S., Fenech M., Neri M., Bonassi S. gammaH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies // Mutat. Res. – 2013. – Vol. 753. – P. 24-40.

115. Vanpouille-Box C., Diamond J.M., Pilonis K.A. et al. TGF-beta Is a master regulator of radiation therapy-induced antitumor immunity // Cancer Res. – 2015. – Vol. 75(11). – P. 2232-2242.

116. Wang J.Z., Huang Z., Lo S.S., Yuh W.T., Mayr N.A. A generalized linear-quadratic model for radiosurgery, stereotactic body radiation therapy, and high-dose rate brachytherapy // Sci. Transl. Med. – 2010. – Vol. 2. – P. 39-48. 10.1126/scitranslmed.3000864.

117. Wennerberg E., Lhuillier C., Vanpouille-Box C. et al. Barriers to radiation-induced in situ tumor vaccination // Front Immunol. – 2017. – Vol. 8. – P. 229.

118. Withers H.R. The four R's of radiotherapy // *Adv. Radiat. Biol.* – 1975. – Vol. 5. – P. 241-247.
119. Withers H.R., Thames H.D., Peters L.J. A new isoeffect curve for change in dose per fraction // *Radiother. Oncol.* – 1983. – Vol. 1. – P. 187-191.
120. Withers H.R. Biologic basis for altered fractionation schemes // *Cancer.* – 1985. – Vol. 55. – P. 2086-2095.
121. Withers H.R., Taylor J.M.G., Maciejewski B. Treatment volume and tissue tolerance // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1988. – Vol. 14. – P. 751.
122. Wulf J., Baier K., Mueller G. et al. Dose-response in stereotactic irradiation of lung tumors // *Radiother. Oncol.* – 2005. – Vol. 77. – P. 83-87.
123. Xu M.M., Pu Y., Han D. et al. Dendritic cells but not macrophages sense tumor mitochondrial DNA for cross-priming through signal regulatory protein alpha signaling // *Immunity.* – 2017. – Vol. 47(2). – P. 363-373-e5.
124. Yamada Y., Bilsky M.H., Lovelock D.M. et al. High-dose, single-fraction image-guided intensity-modulated radiotherapy for metastatic spinal lesions // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2008. – Vol. 71(2). – P. 484-490.
125. Yin Yang, Lei Deng, Yufan Yang et al. Efficacy and Safety of Combined Brain Radiotherapy and Immunotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer With Brain Metastases: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Clinical Lung Cancer.* – 2022. – Vol. 23(2). – P. 95-107.
126. Zaretsky J.M., Garcia-Diaz A., Shin D.S. et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – Vol. 375(9). – P. 819-829.
127. Zhang S., Zhang D., Sun B. Vasculogenic mimicry: current status and future prospects // *Cancer Lett.* – 2007. – Vol. 254, № 2. – P. 157-164.
128. Zindler J.D., Thomas C.R. Jr., Hahn S.M. et al. Increasing the Therapeutic Ratio of Stereotactic Ablative Radiotherapy by Individualized Isotoxic Dose Prescription // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* – 2015. – Vol. 108, № 2. – djv305. – <https://doi.org/10.1093/jnci/djv305>.

ISBN 978-5-6048249-0-0



Отпечатано в ООО «АРТЕК»,
СПб, 6-я линия В.О., д.3/10
E-mail: artek-1@mail.ru, т. +7(911) 239-25-32
Подписано в печать 09.12.22
Формат 60x90/16. Печ. л. 9.
Тираж 50 экз.