

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
MINISTRY OF HEALTHCARE OF THE RUSSIAN FEDERATION
ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО (ФМБА РОССИИ)
FEDERAL MEDICAL BIOLOGICAL AGENCY (THE FMBA OF RUSSIA)

МЕДИЦИНСКАЯ РАДИОЛОГИЯ И РАДИАЦИОННАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

MEDICAL RADIOLOGY AND RADIATION SAFETY

Meditsinskaia Radiologiia i Radiatsionnaia Bezopasnost

2019

Том 64

№ 4

Периодический научный журнал. Издается с 1956 года
Periodical scientific journal. Published since 1956

Журнал включен в перечень ВАК ведущих рецензируемых научных журналов,
рекомендованных для опубликования результатов диссертационных исследований.
The journal is included in the list of VAK (Higher Attestation Commission) of the leading
peer-reviewed scientific journals recommended for publication of the results of thesis works

Журнал вошел в международную библиографическую базу данных Scopus
и в Перечень Russian Science Citation Index (RSCI), размещенный на платформе Web of Science
The journal entered the bibliographic database Scopus
and the Russian Science Citation Index (RSCI), hosted on the Web of Science platform

Москва
Moscow

МЕДИЦИНСКАЯ РАДИОЛОГИЯ И РАДИАЦИОННАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

Журнал основан в январе 1956 года
(до 30 декабря 1993 года выходил под названием «Медицинская радиология»)
Периодичность издания: шесть выпусков в год

ISSN 1024-6177 (Print)

ISSN 2618-9615 (Online)

Журнал выходит при поддержке Федерального медико-биологического агентства России (ФМБА России)

Главный редактор В.В. УЙБА – д.м.н., проф.

Редакционная коллегия:

Г.М. Аветисов – д.б.н., проф.; Р.В. Арутюнян – д.ф.-м.н., проф.; А.В. Бойко – д.м.н., проф.;
А.П. Бирюков – д.м.н., проф.; А.Ю. Бушманов – д.м.н., проф.; А.А. Вайнсон – д.б.н., проф.;
В.Ф. Демин – д.т.н., к.ф.-м.н., доцент; И.П. Коренков – д.б.н., к.т.н., проф.;
А.Н. Котеров – д.б.н.; М. Марков – PhD, проф., США; Б.Я. Наркевич – д.т.н., к.ф.-м.н., проф., научный и выпускающий редактор;
К. Нурлыбаев – к.т.н.; В.В. Романов; А.С. Самойлов – д.м.н., зам. главного редактора, проф. РАН;
М.К. Сневе – PhD, Норвегия; С.И. Ткачев – д.м.н., проф.; И.Е. Тюрин – д.м.н., проф.;
П. Урингтон – PhD, проф., США; Б.Н. Фаунтес – PhD, США;
Н.К. Шандала – д.м.н.; А.В. Шафиркин – д.б.н.; С.М. Шинкарев – д.т.н.

Редакционный совет:

С.С. Алексанин – д.м.н., проф., Санкт-Петербург; М.И. Балонов – д.б.н., проф., Санкт-Петербург;
А.Х. Гонзалес – академик, представитель НКДАР ООН, член МАГАТЭ, Аргентина; М.В. Забелин – д.м.н., проф.;
В.К. Иванов – д.т.н., проф., член-корр. РАН, Обнинск; Л.А. Ильин – д.м.н., проф., академик РАН;
П.К. Казымбет – д.м.н., проф., Казахстан; Н.М. Оганесян – д.м.н., проф., Армения;
М. Пинак – член МАГАТЭ; А.В. Рожко – д.м.н., доцент, Белоруссия; В.А. Саенко – д.б.н., ассоциированный проф., Япония

Все статьи в журнале печатаются бесплатно

Заведующая редакцией Э.С. Зубенкова
Компьютерная верстка В.В. Колесниченко
Технический редактор В.В. Колесниченко

Адрес редакции журнала:

123182, Москва, ул. Живописная, 46
Телефон: (499) 190-95-51

E-mail: medradiol@yandex.ru

Сайт журнала: <http://www.medradiol.ru>

Годовой подписной индекс Агентства «Роспечать» – 71814

Подписано в печать 10.07.2019. Формат 60 × 88/8

Печать офсетная. 11,0 печ. л. Тираж 1000 экз. Заказ №

Отпечатано в ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. 123182, Москва, ул. Живописная, 46

MEDICAL RADIOLOGY AND RADIATION SAFETY

The journal was founded in January 1956
Up to 30 December 1993 was published under the title «Medical Radiology»
Frequency of publication: six issues per year

ISSN 1024-6177 (Print)

ISSN 2618-9615 (Online)

The journal is published with support of The Federal Medical-Biological Agency of Russia FMBA of Russia

Editor in Chief Vladimir Uiba – Dr. Sci. Med., Prof.

Editorial Board:

G. M. Avetisov – Dr. Sci. Biol., Prof.; R. V. Arutyunyan – Dr. Sci. Phys.-Math., Prof.; A. V. Boiko – Dr. Sci. Med., Prof.;
A. P. Biryukov – Dr. Sci. Med., Prof.; A. Yu. Bushmanov – Dr. Sci. Med., Prof.; A. A. Wainson – Dr. Sci. Biol., Prof.;
V. F. Demin – Dr. Sci. Tech., Cand. Sci. Phys.-Math., Assistant Prof.; I. P. Korenkov – Dr. Sci. Biol., PhD Tech., Prof.;
A. N. Koterov – Dr. Sci. Biol.; M. Markov – Prof., USA; B. Ya. Narkevich – Dr. Sci. Tech., PhD Phys.-Math., Prof., Scientific and Production
Editor; K. N. Nurlybaev – PhD Tech.; V. V. Romanov; A. S. Samoylov – Dr. Sci. Med., Deputy Chief Editor, Prof. of RAS;
M. K. Sneve – Norway; S. I. Tkachev – Dr. Sci. Med., Prof.; I. E. Tyurin – Dr. Sci. Med., Prof.; P. Wrington USA; B. N. Fountas – USA;
N. K. Shandala – Dr. Sci. Med.; A. V. Shafirkin – Dr. Sci. Biol.; S. M. Shinkarev – Dr. Sci. Tech.

Editorial Council:

S. S. Aleksanin – Dr. Sci. Med., Prof.; M. I. Balonov – Dr. Sci. Biol., Prof.;
A. J. Gonzalez – Academician, Member of the IAEA; M. V. Zabelin – Dr. Sci. Med., Prof.;
V. K. Ivanov – Dr. Sci. Tech., Prof., Chairman of the Russian Scientific Commission on Radiological Protection,
Corresponding Member of RAS, L. A. Ilyin – Dr. Sci. Med., Prof., Academician of RAS;
P. K. Kazymbet – Dr. Sci. Med., Prof., Kazakhstan; N. M. Oganessian – Dr. Sci. Med., Prof., Armenia;
M. Pinak – Member of the IAEA; A. V. Rozhko – Dr. Sci. Med., Associate Prof., Belarus; V. A. Saenko – Dr. Sci. Biol., Associate Prof., Japan

All articles in the journal are printed free of charge

Head of Editorial Office: E. S. Zubenkova
Computer-aided makeup: V. V. Kolesnichenko
Technical Editor: V. V. Kolesnichenko

Address of Editorial Board:

46, Zhivopisnaya st., 123182, Moscow, Russia
Phone: +7 (499) 190-95-51

E-mail: medradiol@yandex.ru

The journal website: <http://www.medradiol.ru>

The annual subscription index Agency «Rospechat» – 71814

Signed to print 10.07.2019. Format 60 × 88/8

Offset printing. 11,0 printed sheets. 1000 copies. Order #

Printed by SRC-FMBC.

123182, Moscow, Zhivopisnaya st. 46

СОДЕРЖАНИЕ № 4 – 2019

- РАДИАЦИОННАЯ
БИОЛОГИЯ
- 5 **Сила связи. Сообщение 1. Градации относительного риска**
А.Н. Котеров, Л.Н. Ушенкова, Э.С. Зубенкова, А.А. Вайнсон, М.В. Калинина, А.П. Бирюков
- 18 **Влияние облучения в сверхвысоких дозах на криоконсервированные мезенхимальные стволовые клетки: двунитевые разрывы ДНК и пролиферативная активность**
А.А. Цишинатти, М.В. Пустовалова, А.К. Грехова, Ю.А. Бушманов, Т.А. Астрелина, И.В. Кобзева, В.А. Никитина, В.А. Брунчуков, Д.Ю. Усупжанова, И.М. Барабаиш, Т.М. Блохина, Ю.А. Федотов, Н.Ю. Воробьева, А.С. Самойлов, А.Н. Осипов
- РАДИАЦИОННАЯ
БЕЗОПАСНОСТЬ
- 25 **Радиационно-экологический мониторинг агроэкосистем в зоне воздействия АЭС: методология и результаты исследований**
В.К. Кузнецов, Н.И. Санжарова, А.В. Панов, Н.Н. Исамов
- РАДИАЦИОННАЯ
МЕДИЦИНА
- 32 **Полногеномное ассоциативное исследование связи полиморфных локусов с повышенной частотой хромосомных aberrаций у лиц, подвергавшихся длительному радиационному воздействию**
М.В. Халюзова, М.М. Цыганов, Д.С. Исубакова, Е.В. Брониковская, Т.В. Усова, Н.В. Литвяков, А.Б. Карпов, Л.Р. Тахауова, Р.М. Тахауов
- ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ
- 41 **Лучевая терапия у больных раком шейки матки, осложненным гидронефрозом**
А.В. Бойко, Е.А. Дунаева, Л.В. Демидова, Б.Я. Алексеев, А.В. Леонтьев, О.Б. Дубовецкая, Л.Г. Серова
- ЯДЕРНАЯ МЕДИЦИНА
- 48 **Радиометрический контроль утечки химиопрепарата при регионарной перфузии хирургически изолированной конечности**
Б.Я. Наркевич, С.В. Ширяев, И.В. Лагутина, Ю.В. Буйденко, Т.К. Харатишвили, Н.С. Петроченко
- РАДИАЦИОННАЯ
ФИЗИКА, ТЕХНИКА И
ДОЗИМЕТРИЯ
- 56 **Uncertainty of Measurement Absorbed Dose by Gafchromic EBT3 Dosimeter for Clinical Electron and Photon Beams of Medical Accelerators**
E.S. Sukhikh, L.G. Sukhikh, E.L. Malikov, P.V. Izhevsky, I.N. Sheino, A.V. Vertinsky, A.A. Baulin
- ОБЗОР
- 64 **Hyperthermia for Deep Seated Tumours – Possibilities of Heating with Capacitive Devices**
O.K. Kurpeshev, J. Van der Zee, M. Cavagnaro
- В ПОМОЩЬ
ПРАКТИЧЕСКОМУ
ВРАЧУ
- 76 **SPECT/CT in Treatment Monitoring of Osteosarcoma's Metastases**
A.D. Ryzhkov, A.S. Krylov, G.N. Machak, S.M. Kaspshik, A.B. Bludov, Y.A. Shchipakhina, N.V. Kochergina

CONTENTS No. 4 – 2019

RADIATION BIOLOGY	5	Strength of Association. Report 1. Graduations of Relative Risk <i>A.N. Koterov, L.N. Ushenkova, E.S. Zubenkova, A.A. Wainson, M.V. Kalinina, A.P. Biryukov</i>
	18	Influence of Ultra-High Dose Radiation on Cryopreserved Mesenchymal Stem Cells: DNA Double-Strand Breaks and Proliferative Activity <i>A.A. Tsishnatti, M.V. Pustovalova, A.K. Grekhova, Yu.A. Bushmanov, T.A. Astrelina, I.V. Kobzeva, V.A. Nikitina, V.A. Brunchukov, D.Yu. Usupzhanova, I.M. Barabash, T.M. Blokhina, Yu.A. Fedotov, N.Yu. Vorobyova, A.S. Samoylov, A.N. Osipov</i>
RADIATION SAFETY	25	Radioecological Monitoring of Agroecosystems in the NPP Vicinity: Methodology and Results of Investigations <i>V.K. Kuznetsov, N.I. Sanzharova, A.V. Panov, N.N. Isamov</i>
RADIATION MEDICINE	32	Genome Wide Association Study of an Association between Gene Polymorphisms and the Increased Frequency of Cytogenetic Abnormalities in the Persons Exposed to Long-Term Irradiation <i>M.V. Khalyuzova, M.M. Tsyganov, D.S. Isubakova, E.V. Bronikovskaya, T.V. Usova, N.V. Litviakov, A.B. Karpov, L.R. Takhauova, R.M. Takhauov</i>
RADIATION THERAPY	41	Radiotherapy for Patients with Hydronephrosis–Induced Cervical Cancer <i>A.V. Boyko, E.A. Dunaeva, L.V. Demidova, B.Ya. Alekseev, A.V. Leont'ev, O.B. Dubovetskaya, L.G. Serova</i>
NUCLEAR MEDICINE	48	Leakage Radiometric Control of Chemical Drugs with Regional Perfusion of Surgical Isolated Limbs <i>B.Ya. Narkevich, S.V. Shiryaev, I.V. Lagutina, Yu.V. Buydenok, T.K. Kharatishvili, N.S. Petrochenko</i>
RADIATION PHYSICS, TECHNOLOGY AND DOSIMETRY	56	Uncertainty of Measurement Absorbed Dose by Gafchromic EBT3 Dosimeter for Clinical Electron and Photon Beams of Medical Accelerators <i>E.S. Sukhikh, L.G. Sukhikh, E.L. Malikov, P.V. Izhevsky, I.N. Sheino, A.V. Vertinsky, A.A. Baulin</i>
REVIEW	64	Hyperthermia for Deep Seated Tumours – Possibilities of Heating with Capacitive Devices <i>O.K. Kurpeshev, J. Van der Zee, M. Cavagnaro</i>
MEDICAL PRACTICE ISSUE	76	SPECT/CT in Treatment Monitoring of Osteosarcoma's Metastases <i>A.D. Ryzhkov, A.S. Krylov, G.N. Machak, S.M. Kaspshik, A.B. Bludov, Y.A. Shchipakhina, N.V. Kochergina</i>

А.Н. Котеров¹, Л.Н. Ушенкова¹, Э.С. Зубенкова¹, А.А. Вайнсон², М.В. Калинина¹, А.П. Бирюков¹

СИЛА СВЯЗИ. СООБЩЕНИЕ 1. ГРАДАЦИИ ОТНОСИТЕЛЬНОГО РИСКА

1. Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва. E-mail: govovilga@inbox.ru;
2. Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва

А.Н. Котеров – зав. лаб., д.б.н.; Л.Н. Ушенкова – в.н.с., к.б.н.; Э.С. Зубенкова – в.н.с., к.б.н.;

А.А. Вайнсон – руководитель группы, в.н.с., д.б.н., проф.; М.В. Калинина – инженер;

А.П. Бирюков – зав. отд., д.м.н., проф.

Реферат

Цель: Создание сводки данных по градациям величины эффекта для первого критерия причинности Хилла «сила ассоциации» по параметру относительного риска (RR).

Материал и методы: Обзорное исследование опубликованных источников: монографии, пособия, статьи, учебный материал по статистике в различных дисциплинах (в том числе on-line) и др. (128 ссылок; из них порядка 30 пособий по эпидемиологии, канцерогенезу и статистике в медицине).

Результаты: Для величины RR из собранной сводки данных (1980–2018) следует неоднородность в понятиях. Наиболее распространены ссылки на шкалу Монсона (два издания монографии по эпидемиологии профессиональных воздействий – Monson R.R., 1980; 1990). Оптимальная, на наш взгляд, градация может быть выработана на основе этой шкалы, которая должна включать как диапазон отсутствия эффекта ($RR = 0,9-1,2$), так и диапазоны слабой ($RR = 1,2-1,5$, или $0,7-0,9$), умеренной ($RR = 1,5-3,0$, или $0,4-0,7$), сильной ($RR = 3,0-10,0$; или $0,1-0,4$) и очень сильной ($RR = 10,0-40,0$; или $0,0-0,1$) связи. Представлены примеры эпидемиологических эффектов с подавляющей силой связи ($RR > 40,0$). Для воздействия талидомида RR достигал тысяч, для диэтилстилбестрола – условной бесконечности, а при облучении в детском возрасте частота некоторых раков возрастала в десятки и даже сотни раз. Кратко рассмотрены юридические аспекты выплаты компенсаций исходя из RR. Согласно правилу Дауберта (Daubert ruling, Daubert standard) по прецеденту 1993 г., в США значимыми признаются риски только при $RR > 2,0$, когда вероятность причинности более 50 %.

Выводы: Для оценки величины RR следует пользоваться наиболее распространенной и официально устоявшейся шкалой Монсона, хотя и с расширением в диапазоне сверхвысоких рисков. Настоящее исследование может быть использовано как справочное руководство по градациям силы эффекта по RR (OR) для самых разных описательных дисциплин.

Ключевые слова: градации величины эффекта, ординальные шкалы, относительный риск, эпидемиология

Поступила: 04.06.2019. Принята к публикации: 19.06.2019

1. Введение и постановка проблемы для цикла сообщений: ассоциации и критерии их причинности

Оценка причинности явлений и ассоциативных связей – краеугольный камень как нашей обыденной жизни [1]¹, так и практически всех научных дисциплин, включая эмпирические и описательные: философии [2, 3], биологии, эпидемиологии, медицины, физики [4], химии [5]², экономики [7], социологии [4, 8], юриспруденции [9], психологии [4] и др. [4, 10].

Во всех этих областях (кроме философии) доказательность может основываться на выявлении статистически значимых ассоциаций: между причиной и следствием, между воздействием и эффектом, между

характеристикой группы и ее последующими поведенческими особенностями, и пр. [4]. В экспериментальных дисциплинах с возможностью устанавливать условия опыта, получение подобных доказательств очевидно (экспериментальным называется подход, когда можно проконтролировать хотя бы один варьирующий фактор из многих [11]). Выявление в эксперименте статистически значимой ассоциации или корреляции – это *конечный* этап доказательности (что относится и к рандомизированным контролируемым испытаниям в медицине [4, 11]) [12]. Данное положение, вероятно, настолько глубоко входит в подсознание экспериментаторов, что нередко распространяется ими (а, затем, и массами населения) на все остальные дисциплины и области человеческого деятельности, где никаких контрольных опытов поставить нельзя. То, что для описательных дисциплин, включающих вместе с эпидемиологией экономику, социологию, психологию и др., «ассоциация не означает каузацию» (то есть причинность; парафраз из [13]), какой бы статистической значимости ни была корреляция, ясно далеко не всем.

И мы видим такие яркие примеры соответствующего рода, как физиолого-социолого-экономическое изыскание Westling T., 2011 [14], вышедшее из

¹ Рудиментарное понимание причины и следствия приобретает большинством людей самостоятельно и намного раньше, чем этому их мог кто-то научить. Ребенок еще до того, как научится говорить, уже понимает связь между плачем и появлением матери, а также связь между ней и кормлением [1].

² Хотя ныне и указывается, что «Физика и химия полностью отказались от концепций причины и следствия; данные термины больше не используются в этих науках [с конца 19 в.]» [6]. Такое положение сложилось в связи с введением квантовой теории, что привело к принятию индетерминизма и к отказу от классических понятий причины и следствия [4–6].

Хельсинкского Центра экономических исследований (Helsinki Center of Economic Research), в котором показано, что для 76 стран мира (почти все континенты) величина валового внутреннего продукта (ВВП) связана статистически значимой обратной зависимостью ($r = -0,447$) со средним линейным размером пениса у мужского населения. В «Заключении» статьи автор отмечает: «Несколько удивительно, что длина пениса являлась более строгой детерминантой экономического развития, чем политический режим страны». (Somewhat surprisingly, penile length was a stronger determinant of economic development than country's political regime type.³ – здесь и далее перевод А.К.) [14]³.

В недавней публикации одного из нас на тему причинности в эпидемиологии [15] приведен значительный массив примеров ложных ассоциаций как из нерadiационной области, так и для лучевых эффектов в популяциях человека. В указанный обзор также вошли сведения о некоторых страннх ассоциациях (например, о корреляции между потреблением мороженого и смертностью от утоплений [16, 17] или убийств [18]; эти данные приводятся в западных пособиях [16–18] как курьезные). Но до публикации по связи ВВП с длиной пениса дело тогда не дошло.

Имеется достаточно примеров ложных ассоциаций/корреляций и для медицины с эпидемиологией (см. в [15]); некоторые из них, внедренные в практику либо профилактику, вписали если не трагичные, то весьма неприятные страницы в современную медицину (скажем, гормональная терапия после менопаузы [19]), включая радиационную эпидемиологию (например, якобы атрибутивность облучению повышения частоты онкозаболеваемости после проведения компьютерной томографии в детском возрасте [20]).

В связи со сказанным еще раз отметим, что для эпидемиологии установление статистически значимой ассоциации между двумя явлениями, в отличие

³ Эта работа – не пародия и не датирована 1 апреля (дата выхода – июль). Публикация, хотя и названная «дискуссионной», находится в качестве рядовой в базе работ на сайте названного Хельсинкского Центра. Исследование выполнено вполне серьезно: в начале статьи автор приносит благодарности ряду таких же изыскателей за «проницательные комментарии» и за предоставление сведений о размерах пениса, а в приложениях находятся все исходные данные. Но дела с ВВП были связаны вовсе не с размерами указанного органа, а с расовой физиологией, которая оказалась вмешивающимся фактором (то есть «конфаундером» [4, 7, 12, 13]). А именно: на графике зависимости ВВП от длины пениса из [14] «сверху и слева» представлены развитые страны Азии (Южная Корея, Япония, Сингапур и др.), а «справа и внизу» – неразвитые страны Африки (Чад, Судан и т.п.). Остальные страны в большинстве распределены посередине. Отсюда и выявилась «высокая корреляция». Этот момент в [14] почему-то не обсуждается, зато имеются гипотезы о влиянии тестостерона, уровень которого, согласно Т. Westling, отражается на склонности населения к рискам, в том числе экономическим.

от экспериментальных дисциплин, является только самым первым, *исходным* этапом доказательства причинности [12], хотя и необходимым: без доказанной ассоциации не может быть исследования причинности [13, 21]⁴.

Чтобы подтвердить причинность ассоциации, вслед за постулатами Генле–Коха XIX в. для инфекционных заболеваний, в 1950–1970-х гг. в эпидемиологии был разработан ряд пунктов ('points') [24], положений ('viewpoints') [13], руководящих принципов ('guidelines') [25], критериев ('criteria') [26], постулатов ('postulate') [27] и др. (см. в [15, 21] для оценки причинности хронических, неинфекционных патологий. Названные термины означают по сути одно и то же, а качественные отличия их по силе утверждения служат только отражением субъективных позиций авторов. Наиболее известны девять критериев причинности Хилла (Austin Bradford Hill) [13], которые этот весьма авторитетный в прошлом английский статистик в области медицины и эпидемиологии только собрал воедино, взяв у других авторов (подробнее см. в [15, 21, 28])⁵. Тем не менее, теперь критерии причинности в эпидемиологии называются почти всюду «критериями Хилла» [1, 6, 9, 12, 15, 21, 28, 29]. Вероятно, чтобы как-то нивелировать эту несправедливость, некоторые авторы указывают, что данные положения «названы в честь сэра Остина Бредфорда Хилла» [9], хотя такой вывод ниоткуда не следует.

Мы не будем здесь не только разбирать, но даже перечислять девять критериев Хилла⁶, скажем только, что сам Хилл подчеркивал, что это никакие не строгие правила-критерии, а некие принципы, руководства, чтобы оценить степень вероятности того, что ассоци-

⁴ Теоретически возможна каузация и без выявляемой ассоциации; этот вопрос был разобран ранее одним из нас [15]. Так, в [22] описывается следующий умозрительный пример из Greenland S., Robins J.M., 1986 [23]. Допустим, половина индивидуумов в популяции чувствительна к воздействию и может умереть от него (то есть они будут жить, только если не подвергнутся воздействию), а другая половина может умереть именно из-за отсутствия воздействия (то есть они будут жить, только если подвергнутся воздействию). Если экспозиция распределится по популяции случайным образом, то ожидаемый средний причинный эффект («ассоциация») будет равен нулю: не обнаружится связи между воздействием и смертностью в бесконечно большой популяции. Но для каждого отдельного индивидуума исход будет причинным [22, 23]. Пример не столь уж умозрительный: достаточно представить себе неких тяжелых наркоманов, составивших где-то половину популяции.

⁵ А.В. Hill добавил от себя только один, последний критерий, – аналогию, но он почти не использовался и не используется (см. в [15]).

⁶ Одним из нас выполняется цикл из нескольких подробных сообщений по всем аспектам, в том числе историческим, критериев причинности в медико-биологических дисциплинах. Первая публикация, как сказано, уже увидела свет [15], а вторая, скорее всего, будет опубликована тоже в 2019 г.

ация причинна [13]. Вслед за ним указанное положение повторяется практически в каждом соответствующем источнике на тему причинности [1, 6, 7, 9, 15, 21, 22, 30]. Ведь в философском плане получение абсолютного знания причинности для медико-биологических дисциплин – невозможно, даже в каком угодно эксперименте [2, 7, 13, 22, 31] (подробнее см. в [15]).

Единственный настоящий критерий причинности – временная зависимость, то есть правило, что следствие обязано быть позже причины [1, 7, 13, 21]. Но и здесь имеются сложности, например, при наличии конфаундера в прошлом [29], для поперечных исследований (одновременно определяются и предполагаемая причина, и следствие) [32] или при оценке первопричины наследственных генетических заболеваний, медируемых средой [33]. Известен также факт обратной причинности [1, 7, 13, 20, 29, 33, 34], определяющий, скорее всего, кажущиеся канцерогенные эффекты компьютерной томографии [20].

Среди остальных восьми критериев большое значение придается силе связи [эффекта, ассоциации] (strength of the association [13]). Впервые этот критерий был введен одним из пионеров-исследователей связи между курением и раком легкого, E.C. Hammond (1912–1986; США) в 1955 г. [35]; с тех пор многие авторы отводили ему одну из главных ролей (среди приведенных выше источников – [1, 7, 13, 29, 34]; см. также обзор по частоте использования тех или иных критериев причинности [36]).

Основная идея состоит в том, что чем сильнее ассоциация, тем меньше вероятность влияния как случайности, так и эффекта «третьих», вмешивающихся факторов, то есть конфаундеров [29, 32, 34, 39, 40]. Об этом было много написано еще Хиллом, который поставил данный критерий на первое место [13]. Тем не менее, критерий силы ассоциации не абсолютен: хоть и редко, но возможно наличие таких сильных конфаундеров, которые смогут имитировать сколь угодно высокий уровень связи⁷.

Силу ассоциации определяют по двум параметрам: по относительному риску – RR, либо отношению шансов – OR (эпидемиология) [7, 19, 39, 40, 42, 43], и по силе⁸ корреляции (отчасти эпидемиология, но более – остальные перечисленные выше дисциплины) [7, 39, 40, 43]. В отдельных источниках в качестве субкатегории критерия «Сила ассоциации»

⁷ На заре исследования СПИДа его причины связали с употреблением гомосексуалистами амилнитритов («попперсов»; вдыхание их увеличивает, скажем так, временный темперамент). Значение RR составило 12,3 [41]. Такая величина ассоциации должна быть названа «очень сильной» по каким угодно грациям. Сходным образом, стандартный пример конфаундера – связь между употреблением алкоголя и раком легкого [7, 15, 29], явно может быть очень сильной.

⁸ Иногда встречается русскоязычное: «теснота» [37, 38, 44].

называется другой критерий причинности [Хилла] – «Биологические градиент», то есть наличие дозовой зависимости [7, 43, 45].

Но какие относительные риски должны считаться большими, а какие малыми? Равно: какой величины корреляцию надо учитывать при определении причинности, а какой можно пренебречь, откинув связь? Обнаружилась, как и ранее со шкалой диапазонов доз облучения (от «очень малых» до «очень больших») [46], странная картина отсутствия общепринятой унификации, причем в случае величины корреляции – чуть ли не в течение столетия.

В настоящем обзоре из двух сообщений мы только кратко рассмотрим фундаментальные моменты в рамках критерия силы ассоциации. Цель обзора более практическая: это представление сводки данных по имеющимся ординальным шкалам [7, 19, 42, 44, 47] величин относительного риска и коэффициента корреляции (с возможными обоснованиями).

В Сообщении 1 приведены данные о качественных грациях для величины RR.

2. Сила связи по относительному риску (RR)

Данный подход, как уже отмечалось, обнаружен только для медико-биологических исследований, преимущественно эпидемиологических. Многие авторы, в том числе в объемных пособиях по эпидемиологии, перечисляя критерии причинности и указывая на силу ассоциации, никак не определяют, какой RR свидетельствует о сильной связи, а какой – о слабой. Мы располагали оригиналами порядка 30 таких зарубежных пособий по эпидемиологии, канцерогенезу и статистике в медицине последних лет, в основном оксфордских и тому подобных академических изданий США и Англии, насчитывающих многие сотни страниц, вплоть до тысяч (рекордное включает 2498 страниц (Springer, 2014 г.) [19]). За тремя исключениями [7, 48, 49], ни в одном из них нет граций силы ассоциации ни по какому параметру. Встретились только упоминания о ее незначительной величине при $RR \leq 2,0$ [50], о сильной (strong) связи при $RR > 2,0$ [32, 51], $RR > 1,5-3$ [52], $RR > 2-3$ [53] и о сильной и очень сильной [54] либо умеренно сильной и сильной [55] связи при $RR > 2,0$ и $> 5,0$ соответственно. Разумеется, перечисленные соотношения – никакие не настоящие шкалы грации. В русскоязычных пособиях по эпидемиологии картина несколько иная: в двух из имеющихся у нас четырех российских учебниках (три группы авторов) [44, 47, 56, 57] есть грации, но только по величине коэффициента корреляции [44, 47]⁹.

⁹ Мы располагаем еще несколькими российскими пособиями по доказательной медицине и статистике в медико-биологических исследованиях. В них ничего по теме не обнаружено.

Равным образом, нам встретилось мало упоминаний об ординальных шкалах величины RR и в журнальных публикациях. Все, что обнаружено, представлено ниже, и, исходя из сказанного, сомнительно, что где-то есть нечто более полное.

Судя по некоторым источникам [58, 59], градации величины RR (один из общих терминов: «величина эффекта» – ‘effect size’) были заложены Jerome Cornfield (1912–1979; США), также одним из первых исследователей связи между курением и раком легкого [60, 61]. Этот автор на основе подобной связи путем математических выкладок вывел некое неравенство между величиной эффекта исследуемого воздействия и эффекта возможного конфаундера (Cornfield’s Inequality), позволяющее делать вероятный вывод о наличии истинной причинности. J. Cornfield оценил минимальную величину эффекта конфаундера, который мог бы аннулировать или полностью изменить интересующую зависимость [59, 62, 63]¹⁰. Ныне на основе работ J. Cornfield выведены количественные оценки для эффекта предполагаемого конфаундера, что вкупе с его частотой в популяции позволяет рассчитать вклад этого конфаундера в RR для интересующей зависимости [59, 66].

Словом, первая градация для силы связи по параметру RR имела определенный эпидемиологический смысл. Однако слабая зависимость по Корнфилду начиналась от $RR < 3,0$.

Нам не удалось найти первоисточник соответствующей работы J. Cornfield, где бы такое было указано (просмотрен ряд его статей 1950-х гг.), но названная величина слабой ассоциации по RR неоднократно упоминается в других публикациях. Так, в Wynder E.L., 1987 [67]¹¹ была дана ссылка на исследования J. Cornfield от 1950-х гг. (без источника). Затем в Boffetta P., 2010 [68], со ссылкой уже на Wynder E.L., 1987 [67], называлась величина умеренной или слабой (moderate or weak) ассоциации, когда $RR < 3,0$. Наконец, в критической статье журналиста по поводу сомнительных возможностей эпидемиологии, опубликованной в ‘Science’ в 1995 г. [69], автор приводит

¹⁰ Один из наиболее известных мировых статистиков, Р.А. Фишер (R.A. Fisher; *F*-критерий; уровень значимости $p = 0,05$; ANOVA и др.) был активным «диссидентом», до конца жизни не поверившим в связь между курением и раком легкого [64]. Согласно его гипотезе, независимо наследуются и предрасположенность к курению, и предрасположенность к раку легкого [64, 65]. Проведя некие исследования на близнецах, Р. Фишер получил генетическое объяснение для рака легкого, которое в пересчете на RR составило порядка 3,0 [65]. Однако J. Cornfield показал, что RR для рака легкого у курильщиков составлял от 9 и более и, таким образом, эффект не мог быть объяснен конфаундером [59, 62].

¹¹ E.L. Wynder (США) – один из авторитетных основателей-разработчиков критериев причинности в эпидемиологии (1950 гг.) (см. монографию 1955 г. под его редакцией [35]).

слова известных в то время исследователей из США. Имеются такие утверждения: «Мы ищем относительный риск от трех или более (прежде чем принимать документ для публикации)»¹²; «Мое основное правило: если относительный риск не будет равен, по крайней мере, трем или четырем, то забудьте о нем»¹³. И еще: «Если это относительный риск, равный 1,5, но он показан только в одном исследовании, даже очень хорошо, то вы почешете свой подбородок и скажете: “Может быть”»¹⁴.

Хотя на данную статью журналиста [69] в ‘Science’ пришло множество негодующих комментариев затронутых эпидемиологов (ссылки не приводятся), вывод здесь может быть только один: долгое время в эпидемиологии относительные риски менее 3,0 считались не просто слабыми, а даже незначительными. Собственно говоря, подобное положение упоминалось и в недавнее время. Так, в статье 2012 г., посвященной вопросу о том, не слишком ли высок порог в 3,0 для значимости OR, указывается [70]: «Как отмечают Redelmeier и Yarnell, <...> эпидемиологические исследования уязвимы для конфаундеров небольшой величины. Это приводит скептиков к утверждению, что отношение шансов ниже 3,0 редко указывает на клинически значимое открытие»¹⁵.

И действительно, D.A. Redelmeier и C.J. Yarnell утверждали названное в своей статье 2012 г. [71], помещенной в том же номере, что и [70], хотя и считали подобный высокий порог неуместным.

То, что многие эпидемиологи считают, что только $RR > 2$ [72] и даже $RR > 2-3$ [73] следует воспринимать серьезно, неоднократно отмечается также в иных эпидемиологических источниках (правда, с оговорками относительно реальности и менее сильных связей) [72, 73].

Добавим к этому, что в работе Parascandola M. et al., 2006 [74], посвященной критериям причинности в докладах Surgeon General (Главного хирурга США [44], то есть Министерства здравоохранения США) о различных последствиях курения за 1964 и 1982 гг. [75, 76]¹⁶, указано, что в подборке представленных там ис-

¹² ‘We are looking for a relative risk of three or more [before accepting a paper for publication], particularly if it is biologically implausible or if it’s a brand-new finding.’ [69].

¹³ ‘My basic rule is – if the relative risk isn’t at least three or four, forget it’ [69].

¹⁴ ‘If it’s a 1.5 relative risk, and it’s only one study and even a very good one, you scratch your chin and say maybe’ [69].

¹⁵ ‘As Redelmeier and Yarnell state... clinical epidemiology studies are vulnerable to subtle confounding. This leads sceptics to claim that an odds ratio below 3 rarely indicates a clinically important finding’ [70].

¹⁶ Доклад Министерства здравоохранения США от 1964 г. [75] считается ключевой вехой окончательного доказательства

следований не было выявлено никаких утверждений о причинных зависимостях для $OR < 3.0$.

Короче, в целом можно говорить, что в эпидемиологии значительная часть исследователей разделяла (по крайней мере, ранее) мнение о том, что при $RR < 3,0$ ни о какой серьезной связи говорить не следует¹⁷.

Если перейти в область радиационной эпидемиологии, то сразу обнаружится, что с позиции Корнфилда подавляющее большинство канцерогенных эффектов облучения являются не просто слабыми, а, нередко незначительными, *недоказуемыми*. Исключения невелики: это некоторые раки и лейкозы при облучении в детском возрасте (в том числе рак щитовидной железы), воздействие торотраста и, может быть, еще какие-то отдельные эффекты [11, 77–79] (высокий RR для раннего возраста связан с низкими фоновыми рисками многих патологий у детей [79]).

Прошло некоторое время, и граница слабой связи в умах эпидемиологов отчасти снизилась. Появились такие утверждения: «Относительные риски низкой величины (скажем, меньше чем два) фактически находятся вне разрешающей способности эпидемиологического микроскопа: мы редко можем полностью устранить все источники субъективных смещений, и мы никогда не сможем исключить возможность неидентифицированного и неконтролируемого конфаундера» [80]¹⁸.

Мнения о том, что $RR < 2,0$ отражает только слабую ассоциацию, разделяется многими исследователями [7, 59, 72, 73, 81–86], в том числе в работах последних лет [7, 59].

Анализ источников показал, что ряд авторов все же ввел полные ординальные шкалы для величин RR . Некоторые из градаций, которые опубликованы без ссылок, отражают, вероятно, только индивидуальные представления о «слабом» и «сильном» в эпидемиологии. Но в большинстве иных случаев цитируется шкала Монсона, опубликованная в двух изданиях монографии по эпидемиологии профессиональных воздействий (Monson R.R. 'Occupational Epidemiology'. 1980; 1990 [87, 88]). Эти источники оказались нам не-

связи между курением и раком легкого [1, 7, 12, 15, 19, 22, 27–29, 32, 39, 46].

¹⁷ Закрадывается мысль, что эта величина была обусловлена в том числе спором Дж. Корнфилда с выявленной Р. Фишером связью генетики с раком легкого, которая в терминах риска как раз и выражалась цифрой три [65]. Но доказательств этому мы не имеем.

¹⁸ 'Relative risks of low magnitude (say, less than 2) are virtually beyond the resolving power of the epidemiologic microscope: we can seldom demonstrably eliminate all sources of bias, and we can never exclude the possibility of unidentified and uncontrolled confounding' [80].

доступны, но введенную Ричардом Монсоном (США; Harvard) шкалу удалось полностью реконструировать по множеству иных, не связанных между собой, публикаций (1985–2009 гг.) [48, 89–94].

Общая сводка известных нам данных по градациям величины RR представлена в табл. 1.

Почти все источники, включенные в табл. 1, весомы: это преимущественно пособия и монографии [7, 32, 48, 50–55, 87, 88, 91, 92, 97, 100], публикации авторитетных авторов [12, 59, 67, 68, 72, 82–86, 89, 95, 98, 99, 101–104], документы ВОЗ [81, 90, 94] и презентация, цитирующая другие источники [105]. Сомнения могут вызывать только два документа online. Первый – учебный материал по градациям OR из 'Islamic Medical Education Resource' (Kasule O.M, 2008 [93]), а второй – тоже электронный ресурс – сводка Will G. Hopkins, профессора статистики из университета в Мельбурне (спортивная медицина) [106]. Этот автор попытался объять все – и RR , и OR , и корреляции, и прочие параметры силы эффекта. Кроме электронного ресурса [106], публикации самого W.G. Hopkins со сводками нам не известны (PubMed, Google). Градации двух указанных авторов [93, 106] для RR и OR в свете шкал других авторов (табл. 1) сомнительны и помещены здесь просто для ознакомления.

В целом видно, что, за исключением упомянутой, чем-то весомой монографии Monson R.R., 1980; 1990 [87, 88], на которую часто ссылаются¹⁹, никакой системы понятий слабого, умеренного и высокого риска нет. С одной стороны, данный момент может иметь объективный характер: в разных исследованиях используются различные методы определения, характеризующиеся неодинаковой точностью, разным дизайном, и т.д. [107]. С другой стороны, если стоять на подобных позициях, то эпидемиологические понятия «сильный» и «слабый» эффект (которые реализуются в практические мероприятия для здравоохранения [7, 19, 29, 32, 44, 48, 56, 57, 97]) становятся подверженными субъективному уклону.

Любопытен факт эволюции понятия «незначительный риск», которая наблюдается в оксфордских (Англия²⁰) пособиях по эпидемиологии R.S. Bhopal от 2002 г. (1-е издание) [97] и от 2016 г. (3-е издание) [7] (второго издания мы не имеем). В 2002 г. автор писал: «Эпидемиология не годится для демонстрации нау-

¹⁹ Фрагменты монографии 1990 г. [88] доступны в Google-Book. На наш взгляд, не видна особой значимости материала сравнительно с имеющимися у нас минимум 26 более поздними западными пособиями и монографиями по различным направлениям эпидемиологии. Но в последних, как сказано, градаций силы связи нет, за малым исключением [7, 48], причем в одном таком случае [48] ссылаются, опять же, на работу Monson R.R., 1990 [88].

²⁰ Есть оксфордские издания и из Нью-Йорка.

Таблица 1

Сводка данных по градациям RR

Авторы, ссылка	Нет доказуемой ассоциации (Ignorable)	Слабая (Weak, Small)	Умеренная (Moderate, Modest, Medium)	Сильная (Strong)	Очень сильная
Craun G.F., 1985 [89] (репринт из Monson R., 1980 [87])	1,0–1,2	1,2–1,5	1,5–3,0	3,0–10,0	>10,0 (Infinite [89])
Craun G.F., Calderon R.L., 2005 [90] (адаптировано из Monson R., 1990 [88])	0,9–1,2	1,2–1,5 или 0,7–0,9	> 1,5 или <0,7 ('Moderate to Strong' [90])	–	–
Lilienfeld's Foundations of Epidemiology, 2015 (1-е издание 1975/1976) [48] (адаптировано из Monson R., 1990 [88])	0,9–1,2	1,2–1,5 или 0,7–0,9	>1,5 или <0,7 ('Moderate to strong' [48])	–	–
Oleckno W.A., 2002; 2008 [91, 92] (адаптировано из Monson R., 1980 [87])	–	1,1–1,5 или 0,7–0,9	1,6–3,0 или 0,4–0,6	≥3,1 или 0,0–0,3	–
Kasule O.M., 2008 [93] (по R. Monson). OR	0,9–1,2	1,2–1,5 или 0,7–0,9	1,5–3,0 или 0,4–0,7	3,0–10,0 или 0,1–0,4	>10,0 или <0,1 (Infinite [93])
WHO, 2009 [94] (адаптировано из Monson R., 1990 [88])	1,0	>1,0–<1,5	1,5–3,0	3,1–10,0	>10,0 (Infinite [94])
Monson R., 1980; 1990 [87, 88] (наша реконструкция по [48, 89–94])	0,9–1,2	1,2–1,5 или 0,7–0,9	1,5–3,0 или 0,4–0,7	3,0–10,0 или 0,1–0,4	>10
Rosenthal J.A., 1996 [95, 96] OR	–	1,0–1,5	1,5–2,5	2,5–4,0	>4,0–10,0
Bhopal R.S., 2002 [88]	1,1–1,2	–	–	–	–
Bhopal R.S., 2016 [7]	1,1	<2,0	2,0–3,9	≥4,0	–
WHO, 1986 [81]	–	<2,0–3,0	–	–	–
Wynder E.L., 1987 [67] со ссылкой на положения J. Cornfield (1950-е гг.; источник не указан); Boffetta P., 2010 [68] (со ссылкой на [67])	–	<3,0	–	–	–
Doll R., 1996 [12]	–	<3,0	–	–	–
Temple R., 1999 [98]	–	–	<2,0–3,0	3,0–4,0	>4,0 (введено нами по логике)
Weed D.L., 1999; 2000; 2003; 2004 [82–85]	–	<2,0	–	–	–
Shapiro S., 2000 [99]	<2,0 или >0,5	–	–	–	–
Strom B.L., 2000 [100]; Shakir S.A., Layton D., 2002 [101] (со ссылкой на [100])	–	≤2,0	–	–	–
Schoenbach V.J., Rosamund W.D., 2000 [102] (цитировано по [103]); Schoenbach V.J., 2008 [104]*; Singer R., 2014 [105]**	1,0	1,1–1,3	1,4–1,7 ('Modest'); 1,8–3,0 ('Moderate') [102, 104, 105]	3,0–8,0	По [105]: 8,0–16,0 – Very strong; 16,0–40,0 – Dramatic; >40 – Overwhelming (подавляющая)
Szklo M., 2001 [51, 86]	–	<2,0	–	–	–
Hopkins W.G., 2002 [106]. RR	1,0 ('Trivial' [106])	1,2	1,9	3,0	По [106]: 5,7 (19,0 – Nearly perfect; ∞ – Perfect)
Hopkins W.G., 2002 [106]. OR	1,0 ('Trivial' [106])	1,5	3,5	9,0	По [106]: 32,0 (360,0 – Nearly perfect; ∞ – Perfect)
Bonita R. et al., 2006 [32]	–	–	–	>2,0	–
Kasule O.M., 2008 [93] (по Greenberg and Ibrahim; ссылка не найдена). OR	0,9–1,1	1,2–1,6 или 0,6–0,8	1,7–2,5 или 0,4–0,5	>2,6 или 0,0–0,3	–
Webb P., Bain C., 2011 [55]	–	–	–	>2,0 ('moderate strong'); >5,0 ('strong') [55]	–
Forensic Epidemiology... Ed. by S. Loue, 2013 [50]	≤2,0	–	–	–	–
Clinical Epidemiology... Ed. by P.S. Parfrey, B.J. Barrett, 2015 [54]	–	–	–	>2,0 или <0,5	>5,0 или <0,2
Schild M., 2018 [59]	1,0–1,5	1,5–2,0	2,0–3,0 ('Moderate or Medium' [59])	3,0–4,0	>4,0 (Значительная – Significant [59])
Kestenbaum B., 2019 [52]	–	–	–	1,5–3	–
Bruce N. et al., 2019 [53]	–	–	–	2–3	–

Примечание: * – Обратные значения рисков реципрокны [104].

** – Источник [105] в основном повторяет [104], за исключением оригинальной градации для очень сильных ассоциаций

зальной связи, когда увеличение заболеваемости мало, к примеру – превышение в 10–20 %» [97]²¹. В 2016 г. эта фраза осталась точно такой же, но «избыточными» оказались всего 10 % [7]. Время слабых связей, которые только и остались современной эпидемиологии (все сильные связи, согласно [12], были открыты ранее), диктует, так сказать, свою конъюнктуру²².

Наверное, следует сделать какие-то обобщающие и рекомендуемые выводы. Наше обобщение, добавляющее новый вариант шкалы RR (хотя и суммирующий уже имеющиеся представления), возможно, «плодит дурную бесконечность». Тем не менее, градации силы связи по RR, по нашему мнению, следующие (они могут быть названы, как и у иных авторов [48, 90–92, 94], адаптацией шкалы Монсона, ведь отличия – только в двух последних градациях):

- Неопределяемая связь: 0,9–1,2;
- Слабая связь: 1,2–1,5, или 0,7–0,9;
- Умеренная связь: 1,5–3,0, или 0,4–0,7;
- Сильная связь: 3,0–10,0, или 0,1–0,4;
- Очень сильная связь: 10,0–40,0, или 0,0–0,1;
- Подавляющая связь: >40,0 (реципрокное значение придумайте сами).

Разумеется, мы не настаиваем на своем варианте; читатель сам сможет выбрать представляющийся ему наиболее целесообразным из материала в табл. 1. Поле для нужной конъюнктуры тут широкое, и почти для всего имеются весомые ссылки.

3. Примеры чрезвычайно высоких RR в эпидемиологии

При взгляде на приведенные градации может возникнуть вопрос: а бывают ли в эпидемиологии хронических заболеваний примеры очень сильной или подавляющей связи? Относительно слабых ассоциаций было сказано выше (см. также на тему [12]); собствен-

²¹ 'Epidemiology is not good at demonstrating causal links when the rise in disease incidence is low, for example 10–20 per cent excess' [97].

²² По нашему предположению, снижение R.S. Bhopal величины пренебрежимого риска с 1,2 в 2002 г. до 1,1 в 2016 г. может объясняться в том числе кампанией по ограничению пассивного курения. В течение десятков лет, путем значительных усилий и великого множества работ, реализовавшихся в ряде мета-анализов, удалось в конце концов показать, что у жен курильщиц RR для рака легкого как раз и составляет 1,2–1,25 (к 2004–2006 гг.) [40, 68]. В [68] указано, что это один из немногих примеров, когда сообществом эпидемиологов была принята столь слабая ассоциация за реальную. На деле же получается, что пророст абсолютного риска даже для некурящих жен курильщиц совершенно ничтожен, не говоря уже о лицах, иногда обкуриваемых в ресторанах и на остановках. Хотя проблема пассивного курения имеет, конечно, и иные аспекты. Помимо аллергии и некоторого учащения сердечно-сосудистых патологий [39] – также этического и юридического характера.

но, вся современная эпидемиология и есть слабые ассоциации, какое ее направление ни возьми.

Сила связи и RR в значительной степени зависят от редкости заболевания, то есть низкой величины его фонового уровня (про детские раки в этом плане уже говорилось) [12, 108]. А.В. Hill в своей программной работе 1965 г. [13] рассматривал наблюдения 18 в. Percival Pott (Англия) относительно чрезвычайного учащения рака мошонки у трубочистов. Как указывал R. Doll [109], даже в 20 в. смертность трубочистов от этой опухоли была примерно в 200 раз выше, чем у иных рабочих, а в 18 в. разница, вероятно, была еще значительнее (цитировано по [13]).

Но RR = 200 – это не рекорд. В табл. 2 представлена подборка данных по очень высоким эпидемиологическим эффектам, которая составлена на основе встретившихся в монографиях, пособиях и других источниках примеров (почти всюду одни и те же). Однако никто не рассматривал радиационную эпидемиологию; эти данные добавлены нами.

Таким образом, согласно сводке из табл. 2, RR в сотни – не предел. Бывают RR величиной и в тысячи, как с талидомидом [111], и вовсе как бы стремящиеся к бесконечности [110].

4. Юридический аспект градации величины RR

Имеются данные о том, какую величину риска в судах США принимают за атрибутивную при установлении компенсации за вредность. Так называемое правило Дауберта (Daubert ruling, Daubert standard) выработано по соответствующему прецеденту 1993 г., когда родители детей, рожденных с серьезными дефектами, J. Daubert и E. Schuller, подали в суд иск на фармакологическую компанию, утверждая, что к дефектам привело употребление беременными препарата Bendectin [118]. Суд рассмотрел все возможные данные из различных дисциплин. Коротко говоря, с тех пор в судах США (во всех или некоторых, нам не известно) положительное решение выносится при RR только более двух, причем эксперименты на животных и *in vitro* во внимание, как правило, не принимаются. Значение два имеет тот смысл, что при его превышении теоретическая вероятность причинности эффекта более 50 % [9, 118–125].

Этот юридический подход к оценке достоверности по RR был предложен, судя по всему, в работе Cole P., 1996 [119], которая посвящена критериям причинности на стыке эпидемиологии, социологии и юриспруденции. Данная часто цитируемая работа недоступна, но хорошо реконструируется по другим источникам [120–123].

Таблица 2

Примеры чрезвычайно высоких RR в эпидемиологии

Воздействующий агент – патология	RR	Ссылки
Прием диэтилстилбестрола матерями – аденокарцинома влагалища у дочерей	$\sim\infty^*$	Herbst A.L. et al., 1971 [110]
Прием талидомида беременными – частота пороков развития у потомства	Для разных пороков развития: 175; 4570; 8180	Yang Q. et al., 1997 [111]
Вирусный гепатит В – гепатоцеллюлярная карцинома	232	Beasley R.P. et al., 1981 [112]
Работа трубочистом – рак мошонки	200	Doll R., 1964 [109]; Hill A.B., 1965 [13]
Внешнее облучение детей – рак печени	Германия: 152 Дания – Швеция: 109 Португалия: 42 Япония: 31	UNSCEAR 2013 [79]
Средства влажной дезинфекции (humidifier disinfectants) – патологии легкого	OR в трех исследованиях: 2,73; 47,3; 116,1	Ha M. et al., 2016 [113]
Винилхлорид – ангиосаркома печени	91	Fedeli U. et al., 2019 [114]
Курение – частота рака легкого	до 40–60	Doll R., Hill A.B., 1954–1966; Hammond E.C., Horn D., 1958 (см. в [7, 39, 75, 97] и пр.)
Внешнее облучение детей – рак щитовидной железы Накопление радиоактивного йода в щитовидной железе у детей – рак щитовидной железы	~ 30 [115], до 56 [116] и более**	Лушников Е.Ф. и др., 2006 [115]; Jacob P. et al., 1998 [116]; UNSCEAR 2000; 2006; 2013 [77–79]

Примечание: * – Деление на «0». Исследование «случай–контроль»: из восьми «случаев» рак обнаружен у семи дочерей (88 %), а в «контроле» – из 32 дочерей ни у одной не была зафиксирована такая патология [110].

** – Согласно различным белорусским источникам, описываются еще более высокие эффекты. Так, в работе Белоокая Т.В. и соавт., 2002 [117] указано, что число случаев заболеваний раком щитовидной железы в Белоруссии в 2000 г. по сравнению с дочернобыльским периодом увеличилось у детей в 88,5 раз

С другой стороны, названный юридический подход эпидемиологами критикуется, особенно с тех позиций, что узнать токсичность многих препаратов возможно лишь в опытах на животных, а причинность целого ряда ассоциаций с $RR < 2,0$ все же общепризнана [9, 124].

5. Заключение

В данном разделе основной массив ссылок не приводится; их можно найти выше.

В отличие от экспериментальных дисциплин с рандомизированным дизайном исследования и параллельным контролем (контролями), где выявление статистически значимой ассоциации является конечным этапом доказательности, для описательных дисциплин это только самый исходный, первый этап установления причинности. Последнее обусловлено тем, что на связи двух переменных могут отражаться неконтролируемые факторы – случайности, субъективные уклоны (bias), вмешивающиеся факторы (конфаундеры), обратная причинность и др. [12, 19, 32, 34]. В результате в 1950–1970-х гг. сформировался комплекс критериев (= пунктов, положений, руководящих принципов, постулатов и др.) для оценки причинности хронических, неинфекционных патологий.

Наиболее известны девять критериев причинности Хилла (A.B. Hill), собранных и сформулированных им в 1965 г. Первым среди них называлась сила ассо-

циации: чем сильнее связь, тем менее вероятно, что на ней отражаются посторонние, непричинные факторы – случайности и конфаундеры. Мнение о первостепенной важности критерия силы ассоциации разделялось позже и другими авторами. Сила ассоциации, исходя из большинства источников, определяется по двум параметрам: по относительному риску, RR (либо отношению шансов, OR), и по величине коррелятивной связи, в основном линейного типа с коэффициентом корреляции Пирсона. Хотя, согласно некоторым авторам, статистическая значимость корреляции для эпидемиологии не определяет в силе связи ничего, важен только RR [122, 126].

В массе объемных пособий по эпидемиологии, преимущественно зарубежных, равно как и в изданиях по иным описательным дисциплинам (психологии, социологии и др.), а также в публикациях на тему, часто обсуждаются критерии причинности, называется сила ассоциации, но редко приводится качественная градация этой силы и соответствующие шкалы. В представленном Сообщении 1 были рассмотрены все такие опубликованные данные по величине RR (в отдельных случаях – OR).

Из собранной сводки данных (1980–2018) следует заметная неопределенность в понятиях о величине RR. Наиболее распространены ссылки на шкалу Монсона (из двух изданий монографии по эпидемиологии профессиональных воздействий от 1980 г. и

1990 г.). Оптимальная (на наш взгляд) градация может быть выработана именно на ее основе, и она должна включать как диапазон отсутствия эффекта ($RR = 0,9-1,2$), так и диапазоны слабой ($RR = 1,2-1,5$, или $0,7-0,9$), умеренной ($RR = 1,5-3,0$, или $0,4-0,7$), сильной ($RR = 3,0-10,0$; или $0,1-0,4$) и очень сильной ($RR = 10,0-40,0$; или $0,0-0,1$) связи.

Попутно были представлены примеры эпидемиологических эффектов с не просто очень сильной, а с подавляющей силой связи ($RR > 40,0$) для нерадиационных и лучевых воздействий. Для известного эффекта талидомида риск достигал тысяч, для диэтилстилбестрола – условной бесконечности, а при облучении в детском возрасте частота некоторых раков возрастала в десятки и даже сотни раз.

Второй подход по оценке силы ассоциации – по величине корреляции, наиболее распространен в психо-социологических направлениях, но может быть полезен и для медико-биологических дисциплин, в том числе радиационного профиля. Экспериментальная радиобиология и радиационная медицина во многом сводятся именно к миру корреляций. Этот подход запланировано рассмотреть в Сообщении 2.

Настоящее исследование не имеет, судя по всему, аналогов по его полноте и охвату источников на тему и может быть использовано как справочное руководство по градациям RR . Особенную важность установление стандартизированных градаций RR должно иметь как для радиационно-эпидемиологических исследований [11, 15, 20, 46, 77–79, 127], так и для информационно-аналитического обеспечения таковых [128]. В последнем случае необходимость четкой градации величины эффекта может следовать из методологии кодирования параметров при занесении в информационное хранилище, объединяющее данные из множества используемых источников [128], предусматривающих различные качественные и количественные оценки показателей.

Для цитирования: Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Зубенкова Э.С., Вайнсон А.А., Калинина М.В., Бирюков А.П. Сила связи. Сообщение 1. Градации относительного риска // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 5–17.

DOI: 10.12737/article_5d1adb25725023.14868717

Strength of Association. Report 1. Graduations of Relative Risk

A.N. Koterov¹, L.N. Ushenkova¹, E.S. Zubenkova¹, A.A. Wainson², M.V. Kalinina¹, A.P. Biryukov¹

1. A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Moscow, Russia. E-mail: govorilga@inbox.ru;
2. N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

A.N. Koterov – Head of Lab., Dr. Sci. Biol.; L.N. Ushenkova – Leading Researcher, PhD Biol.; E.S. Zubenkova – Leading Researcher, PhD Biol.; A.A. Wainson – Head of Group, Leading Researcher, Dr. Sci. Biol., Prof.; M.V. Kalinina – Engineer; A.P. Biryukov – Head of Dep., Dr. Sci. Med., Prof.

Abstract

Purpose: To summarize data on graduation of the effect size on the base of Hill's first causality criterion 'Strength of association' on relative risk parameters (RR).

Material and methods: Survey of published sources: monographs, handbooks, papers, educational material on statistics in various disciplines (including on-line), etc. (128 references; of which about 30 handbooks on epidemiology, carcinogenesis and medical statistics).

Results: For the RR value, the collected data summary (1980–2018) implies non-homogeneity in concepts. The most common references are to the Monson scale (two editions of the monograph on the epidemiology of occupational exposures Monson R.R., 1980; 1990). In our opinion, the optimal graduation can be developed on the basis of this scale, and it should include both the range of no effect ($RR = 0.9-1.2$) and the weak ($RR = 1.2-1.5$, or $0.7-0.9$), moderate ($RR = 1.5-3.0$, or $0.4-0.7$), strong ($RR = 3.0-10.0$; or $0.1-0.4$) and very strong ($RR = 10.0-40.0$; or $0.0-0.1$) ranges. Examples of epidemiological effects with overwhelming strength of association are presented ($RR > 40.0$). For the effects of thalidomide, RR reached thousands, for diethylstilbestrol, conditional infinity, and when irradiated in childhood, the frequency of some cancers increased tens and even hundreds of times. The juristic aspects of compensation payment based on RR are briefly reviewed. According to the Daubert ruling (Daubert standard) on the 1993 precedent in the United States, risks are recognized only at $RR > 2.0$, when the probability of causality is more than 50 %.

Conclusions: To estimate the RR value, one should use the most common and officially established Monson scale, albeit with an expansion in the range of dramatic or overwhelming risks. This study can be used as a reference guide on the graduations of effect size on RR (OR) for a wide variety of observed disciplines.

Key words: graduation of effect size, ordinal scales, relative risk, epidemiology

Article received: 04.06.2019. Accepted for publication: 19.06.2019

REFERENCES

1. Rothman KJ. *Epidemiology. An Introduction*. 2nd edition. – Oxford University Press Inc, 2012. 268 p.
2. Hume D. *A Treatise of Human Nature*. Second edition. – Oxford: Oxford University Press, 1978.
3. Mill JS. *A System of Logic*. Book III, Chs. 8-10. – London, 1843.
4. *Causality in the Sciences*. Ed. by P.M. Illari, Russo F, Williamson J. – New York: Oxford University Press, 2011. 882 p. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780199574131.001.0001.
5. Hendry RF. Is there downward causation in Chemistry? In: *Philosophy Of Chemistry*. Ed. by D. Baird, E. Scerri, L. McIntyre. – Dordrecht: Springer, 2006;242:173-89. DOI: 10.1007/1-4020-3261-7_9.
6. Kundi M. Causality and the interpretation of epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect*. 2006;114(7):969-974. DOI: 10.1289/ehp.8297.
7. Bhopal RS. *Concepts of Epidemiology: Integrated the ideas, theories, principles and methods of epidemiology*. 3rd edition. – Oxford: University Press, 2016. 442 p.
8. Brady HE. Causation and explanation in Social Science. *The Oxford Handbook of Political Science*. Ed. by R.E. Goodin. – New York: Oxford University Press, 2011. 64 p. DOI: 10.1093/oxfordhb/9780199604456.013.0049.
9. Egilman D, Kim J, Biklen M. Proving causation: the use and abuse of medical and scientific evidence inside the courtroom – an epidemiologist's critique of the judicial interpretation of the Daubert ruling. *Food Drug Law J*. 2003;58(2):223-50.
10. Gayon J. Chance, explanation, and causation in evolutionary theory. *Hist Philos Life Sci*. 2005;27(3-4):395-405.
11. BEIR VII Report 2006. Phase 2. Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, – National Research Council. <http://www.nap.edu/catalog/11340.html> (Address data 2019.01.23).
12. Doll R. Weak associations in epidemiology: importance, detection, and interpretation. *J Epidemiol*. 1996;6(4 Suppl):S11–S20.
13. Hill BA. The environment and disease: association or causation?. *Proc R Soc Med*. 1965;58(5):295-300. DOI: 10.1177/0141076814562718.
14. Westling T. Male organ and economic growth: does size matter? HECER – Helsinki Center of Economic Research. Discussion Paper No. 335. July 2011. 16 p. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/27239/maleorga.pdf> (Address data 2019.01.23).
15. Koterov AN. Causal criteria in medical and biological disciplines: history, essence and Radiation Aspect. Report 1. Problem statement, conception of causes and causation, false associations. *Radiat Biol Radioecol*. ('Radiation biology. Radioecology', Moscow). 2019;59(1):5-36. (Russian. English abstract.)
16. Vierra A, Pollock J, Golez F. *Reading Educational Research*. 3rd Edition. – Upper Saddle River, N.J. Merrile/Prentice Hall, 1992.
17. Cottrell R, McKenzie JF. *Health Promotion & Education Research Methods: Using the Five Chapter Thesis/Dissertation Model*. 2nd Edition. – Jones & Bartlett Learning, 2010. 345 p.
18. Heath W. *Psychology Research Methods: Connecting Research to Students' Lives*. – Cambridge University Press, 2018. 404 p.
19. *Handbook of Epidemiology*. Second Edition. Ed. by W. Ahrens, I. Pigeot. – New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer, 2014. 2498 p.
20. Boice JD Jr. Radiation epidemiology and recent paediatric computed tomography studies. *Ann ICRP*. 2015;44(1 Suppl):236-48. DOI: 10.1177/0146645315575877.
21. Susser M. What is a cause and how do we know one? A grammar for pragmatic epidemiology. *Am J Epidemiol*. 1991;133(7):635-48. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a115939.
22. Kaufman JS, Poole C. Looking back on 'causal thinking in the health sciences'. *Annu Rev Public Health*. 2000;21:101-19. DOI: 10.1146/annurev.publhealth.21.1.101.
23. Greenland S, Robins JM. Identifiability, exchangeability, and epidemiological confounding. *Int J Epidemiol*. 1986;15(3):413-9. Reprint: *Epidemiol Perspect Innov*. 2009;6(4). DOI: 10.1186/1742-5573-6-4.
24. Sartwell PE. 'On the methodology of investigations of etiologic factors in chronic diseases.' Further Comments. *J Chronic Dis*. 1960;11(1):61-3. DOI: 10.1016/0021-9681(60)90140-5.
25. Susser M. Glossary: causality in public health science. *J Epidemiol Community Health*. 2001;55(6):376-78. DOI: 10.1136/jech.55.6.376.
26. Stallones RA. The association between tobacco smoking and coronary heart disease. Draft Report of June 28 to the Surgeon General's Advisory Committee on Smoking and Health. University of Minnesota Archives, Leonard M. Schuman Papers, Box 52, 'Cardiovascular'. 1963. (Published in: *Int J Epidemiol*. 2015;44(3):735-43. DOI: 10.1093/ije/dyv124.)
27. Evans AS. Causation and disease: The Henle-Koch postulates revisited. *Yale J Biol Med*. 1976;49(2):175-95.
28. Blackburn H, Labarthe D. Stories from the evolution of guidelines for causal inference in epidemiologic associations: 1953-1965. *Am J Epidemiol*. 2012;176(12):1071-7. DOI: 10.1093/aje/kws374.
29. *Epidemiology: Principles and Practical Guidelines*. Ed. by J. Van den Broeck, J.R. Brestoff. – Dordrecht: Springer, 2013. 621 p.
30. Phillips CV, Goodman KJ. Causal criteria and counterfactuals; nothing more (or less) than scientific common sense. *Emerging Themes in Epidemiology*. 2006;3(Article 5):7. DOI: 10.1186/1742-7622-3-5.
31. Lipton R, Odegaard T. Causal thinking and causal language in epidemiology: it's in the details. *Epidemiol Perspect Innov*. 2005;29(2 Article 8). DOI: 10.1186/1742-5573-2-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1198241/pdf/1742-5573-2-8.pdf> (Address data 2019.01.23).
32. Bonita R, Beaglehole R, Kjellstrom T. *Basic epidemiology*. 2nd edition. – World Health Organization, 2006. 212 p.
33. Coughlin SS. *Causal Inference and Scientific Paradigms in Epidemiology*. – Bentham E-book, 2010. 70 p. DOI: 10.2174/97816080518161100101. <https://ebooks.benthamscience.com/book/9781608051816/> (Address data 2019.01.23).
34. Glynn JR. A question of attribution. *Lancet*. 1993;342(8870):530-2.
35. Hammond EC. Cause and effect // In: *The Biologic Effects of Tobacco*. Ed. by E.L. Wynder. – Boston, MA: Little, Brown and Company; 1955. P. 171-96.
36. Weed DL, Gorelic LS. The practice of causal inference in cancer epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996;5(4):303-11.
37. *Answers. Statistics*. Offset – Minsk: BSU, 2010. 38 p. (Russian).
38. Pearson Correlation Criterion. Site 'Medical Statistics'. <http://medstatistic.ru/theory/pirson.html> (Address data 2019.01.23). (Russian).
39. *The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General* Rockville, MD: Office of the Surgeon General, US Public Health Service, 2004. 910 p. <https://www.surgeongeneral.gov/library/reports/50-years-of-progress/full-report.pdf> (Address data 2019.01.23).
40. Goodman SN, Samet JM. *Cause and Cancer Epidemiology* // In: Schottenfeld and Fraumeni *Cancer Epidemiology and Prevention*. 4th Edition. Ed. by M.J. Thun et al. – New York:

- Oxford University Press. Printed by Sheridan Books, Inc, USA, 2018. P. 97-104.
41. Phillips AN, Davey Smith G. Confounding in epidemiological studies. *Brit Med J*. 1993;306(870):142. DOI: 10.1136/bmj.306.6870.142-b.
 42. Holmes LJ. *Applied Epidemiologic Principles and Concepts. Clinicians' Guide to Study Design and Conduct*. – New York: Taylor & Francis, 2018. 316 p.
 43. Mandil A. *Causal Inference in Epidemiology. Lession Presentation*. High Institute of Public Health. University of Alexandria. <https://ru.scribd.com/doc/306778054/Causal-Inference-in-Epidemiology>. Presentation: www.pitt.edu/~super4/33011-34001/33971.ppt (Address data 2019.01.23).
 44. Vlasov VV. *Epidemiology. Second Edition, rev.* – Moscow: GEOTAR-Media, 2006. 464 p. (Russian).
 45. Scheutz F, Poulsen S. Determining causation in epidemiology. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1999;27(3):161-70. DOI: 10.1111/j.1600-0528.1999.tb02006.x.
 46. Koterov AN. From very low to very large doses of radiation: new data on ranges definitions and its experimental and epidemiological basing. *Medical Radiology and Radiation Safety (Moscow)*. 2013;58(2):5-21. (In Russian. English abstract.)
 47. Kornysheva EA, Platonov DY, Rodionov AA, Shabashov AE. *Epidemiology and Statistics as Tools of Evidence-Based Medicine. 2nd Edition, revised and updated*. Tver, 2009. 80 p. (Russian).
 48. Liliensfeld's Foundations of Epidemiology. 4th Edition. Original Ed. by A.M. Liliensfeld; Ed. by D. Schneider, D.E. Liliensfeld. – New York: Oxford University Press, 2015. 333 p.
 49. Berry KJ, Johnston JE, Mielke PW, Jr. *The Measurement of Association. A Permutation Statistical Approach*. – Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2018. – 647 p.
 50. *Forensic Epidemiology in the Global Context*. Ed. by S. Loue. – New York: Springer, 2013. – 157 p.
 51. Szklo M, Nieto FJ. *Epidemiology. Beyond the Basics. 4th Edition*. – Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2019. 577 p.
 52. Kestenbaum B. *Epidemiology and Biostatistics. An Introduction to Clinical Research. 2nd Edition*. Ed. by N.S. Weiss, A. Shoben. – Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2019. 277 p.
 53. Bruce N, Pope D, Stanistreet D. *Quantitative Methods for Health Research. A Practical Interactive Guide to Epidemiology and Statistics. 2nd Edition*. – Oxford: John Wiley & Sons, 2019. 545 p.
 54. *Clinical Epidemiology. Practice and Methods. 2nd edition*. Ed. by P.S. Parfrey, B.J. Barrett. – New York: Humana Press (brand of Springer), 2015. 533 p.
 55. Webb P, Bain C. *Essential Epidemiology. An Introduction for Students and Health Professionals. 2nd Edition*. – Cambridge etc.: Cambridge University Press, 2011. 445 p.
 56. Pokrovsky VI, Pak SG, Briko NI, Danilkin BK. *Infectious Diseases and Epidemiology. Textbook for High Schools. 2nd edition*. – Moscow: GEOTAR-Media, 2007. 816 p. (Russian).
 57. *General Epidemiology with the Basics of Evidence-Based Medicine: a Guide to Practical Exercises: Studies. A Textbook for High Schools*. Ed. by V.I. Pokrovsky, N.I. Briko. 2nd Edition, Corr. and add. – M.: GEOTAR-Media, 2012. 496 p.
 58. Smith GD. Smoking and lung cancer: causality, Cornfield and an early observational meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2009;38(5):1169-71.
 59. Schield M. Confounding and Cornfield: back to the future // In: Proc. 10th International Conference on Teaching Statistics (ICOTS10, July, 2018), Kyoto, Japan. Ed. by M.A. Sorto, A. White, L. Guyot. 2018. 2018. 6 p. <http://www.statlit.org/pdf/2018-Schild-ICOTS.pdf> (Address data 2019.01.24).
 60. Cornfield J. A method of estimating comparative rates from clinical data; applications to cancer of the lung, breast, and cervix. *J Nat Cancer Inst*. 1951;11(6):1269-75. DOI: 10.1093/jnci/11.6.1269.
 61. Cornfield J. Principles of research: 1959. *Stat Med*. 2012;31(24):2760-8. DOI: 10.1002/sim.5413.
 62. Gastwirth JL, Krieger AM, Rosenbaum PR. Cornfield's Inequality// In: *Encyclopedia of Biostatistics, Online*. – John Wiley & Sons, Ltd, 2005. 3 p. DOI: 10.1002/0470011815.b2a03040. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0470011815.b2a03040> (Address data 2019.01.24).
 63. Greenhouse JB. Commentary: Cornfield, Epidemiology and Causality. *Int J Epidemiol*. 2009;38(5):199-201. DOI: 10.1093/ije/dyp299.
 64. Rojo AML. Fisher. Statistical Conclusion. Maybe Yes, Maybe Not. The science. The Greatest Theories: Issue 47: Trans. with ital. M.: De Agostini LLC, 2015. 176 p. <https://www.goodreads.com/series/191514> (Address data 2019.01.24). (Russian).
 65. Fisher RA. *Smoking: The cancer controversy. Some attempts to assess the evidence*. – Edinburgh & London: Oliver and Boyd, 1959. 17 p.
 66. Khoury MJ, James LM, Flanders WD, Erickson JD. Interpretation of recurring weak associations obtained from epidemiologic studies of suspected human teratogens. *Teratology*. 1992;46(1):4669-77. DOI: 10.1002/tera.1420460110.
 67. Wynder EL. Workshop on Guidelines to the Epidemiology of Weak Associations. Introduction. *Prev Med*. 1987;16(2):139-41.
 68. Boffetta P. Causation in the presence of weak associations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010;50(S1):13-6. DOI: 10.1080/10408398.2010.526842.
 69. Taubes G. Epidemiology faces its limits. *Science*. 1995;269(5221):164-9. DOI: 10.1126/science.7618077.
 70. Tugwell P, Knottnerus A, Idzerda L. Is an odds ratio of 3 too high a threshold for true associations in clinical epidemiology?. *J Clin Epidemiol*. 2012;65(5):465-6. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2012.02.009.
 71. Redelmeier DA, Yarnell CJ. Lethal misconceptions: interpretation and bias in studies of traffic deaths. *J Clin Epidemiol*. 2012;65(5):467-73. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2011.09.007.
 72. Weed DL. Weight of evidence: a review of concept and methods. *Risk Anal*. 2005;25(6):1545-57. DOI: 10.1111/j.1539-6924.2005.00699.x.
 73. Gori GB. Epidemiologic evidence in public and legal policy: reality or metaphor? *Critical Legal Issues*. – Washington: Washington Legal Foundation.. Working Paper Series No. 124, 2004. 33 p.
 74. Parascandola M, Weed DL, Dasgupta A. Two Surgeon General's reports on smoking and cancer: a historical investigation of the practice of causal inference. *Emerg Themes Epidemiol*. 2006;3(1): 11 p. DOI: 10.1186/1742-7622-3-1.
 75. US Department of Health, Education and Welfare (USDHEW). *Smoking and Health: Report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Service Publication No. 1103*. Washington DC: U.S. Department of Health, Education and Welfare. 1964. 387 p. <https://profiles.nlm.nih.gov/ps/access/nnbbmq.pdf> (Address data 2019.02.02).
 76. US Department of Health and Human Service. Public Health Service. Office on Smoking and Health. *The Health Consequences of Smoking: Cancer: Report of the Surgeon General*. – Rockville, Mariland, 1982. 322 p. <https://profiles.nlm.nih.gov/NN/B/C/D/W/> (Address data 2019.02.02).
 77. UNSCEAR 2000. Report to the General Assembly, with Scientific Annex. Annex I. Epidemiological evaluation of radiation-induced cancer. United Nations. – New York, 2000. P. 297-450.

78. UNSCEAR 2006. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Annex A. Epidemiological studies of radiation and cancer. United Nations. – New York, 2008. P. 17-322.
79. UNSCEAR 2013. Report to the General Assembly, with Scientific Annex. Vol. II. Annex B. Effects of radiation exposure of children. United Nations. – New York, 2013. P. 1-268.
80. Shapiro S. Meta-analysis/Shmeta-analysis. *Am J Epidemiol.* 1994;140(9):771-8. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a117324.
81. World Health Organization. Epidemiology of occupational health. Ed. by M. Karvonen, M.I. Mikheev. WHO Regional Publications, European Series No. 20. Copenhagen, 1986. 394 p.
82. Weed DL. Higher standards for epidemiologic studies – replication prior to publication? *J Am Med Assoc.* 1999;282(10):937. DOI: 10.1001/jama.282.10.937.
83. Weed DL. Epidemiologic evidence and causal inference. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2000;14(4):797-807.
84. Weed DL. Causation: an epidemiologic perspective (in five parts). *J Low & Policy.* 2003;12(1):43-53. <http://brooklynworks.brooklaw.edu/jlp/vol12/iss1/3> (Address data 2019.01.24).
85. Weed DL. Precaution, prevention, and public health ethics. *J Med Philos.* 2004;29(3):313-32. DOI: 10.1080/03605310490500527.
86. Szklo M. The evaluation of epidemiologic evidence for policy-making. *Am J Epidemiol.* 2001;154(12 Suppl):S13-7.
87. Monson RR. Occupational Epidemiology. – Florida: Boca Raton: CRC Press, 1980. 219 p.
88. Monson RR. Occupational Epidemiology. 2nd Edition. – Florida: Boca Raton, CRC Press Inc, 1990. 312 p.
89. Craun GF. Epidemiologic studies of organic micropollutants in drinking water. *Sci Total Environ.* 1985;47:461-72. DOI: 10.1016/0048-9697(85)90350-X.
90. Craun GF, Calderon RL. How to interpret epidemiological associations // In: Nutrition in Drinking Water. 2005. P. 108-15. WHO. Water Sanitation Gygiene http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/nutrientschap9.pdf (Address data 2019.01.25).
91. Oleckno WA. Essential Epidemiology: Principles and Applications. – Long Grove, Illinois: Waveland Press, 2002. 384 p.
92. Oleckno WA. Epidemiology: Concepts and Methods. – Long Grove, Illinois: Waveland Press, 2008. 649 p.
93. Kasule OM. 0802-Measures of Effect: Rate Ratio and Odds Ratio (Review). Lecture // Islamic Medical Education Resource. 2008. <http://omarkasule-05.tripod.com/id52.html> (Address data 2019.01.25).
94. Calcium and Magnesium in Drinking-water: Public health significance. Ed. by J. Cotruvo, J. Bartram. – Geneva: World Health Organization, 2009. 180 p. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563550_eng.pdf (Address data 2019.01.25).
95. Rosenthal JA. Qualitative descriptors of strength of association and effect size. *J Soc Serv Res.* 1996;21(4):37-59. DOI: 10.1300/J079v21n04_02.
96. De Menezes RF, Bergmann A, Thuler LC. Alcohol consumption and risk of cancer: a systematic literature review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(9):4965-72.
97. Bhopal RS. Concepts of Epidemiology: An integrated introduction to the ideas, theories, principles and methods of epidemiology. – Oxford: University Press, 2002. 317 p.
98. Temple R. Meta-analysis and epidemiologic studies in drug development and postmarketing surveillance. *J Am Med Assoc.* 1999;281(9):841-4.
99. Shapiro S. Case-Control Surveillance // In: Pharmacoepidemiology. 3rd Edition. Ed. by B.L. Strom. – Baffins Lane. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2000. P. 209-30.
100. Strom BL. Study designs available for pharmacoepidemiology studies // In: Pharmacoepidemiology. 3rd Edition. Ed. by B.L. Strom. – Baffins Lane, Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2000. P. 17-30.
101. Shakir SA, Layton D. Causal association in pharmacovigilance and pharmacoepidemiology: thoughts on the application of the Austin Bradford-Hill criteria. *Drug Saf.* 2002;25(6):467-71. DOI: 10.2165/00002018-200225060-00012.
102. Schoenbach VJ, Rosamund WD. Relating risk factors to health outcomes // In: Understanding the Fundamentals of Epidemiology – An evolving text. Chapel Hill, NC: Department of Epidemiology, School of Public Health, University of North Carolina, 2000. P. 161-207.
103. Degelman ML, Herman KM. Smoking and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis using the Bradford Hill criteria for causation. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;17:207-16. DOI: 10.1016/j.msard.2017.07.020.
104. Schoenbach VJ. Relating risk factors to health outcomes. 2008. P. 161-207. <http://www.epidemiolog.net/evolving/RelatingRiskFactorstoHealth.pdf> (Address data 2019.01.25).
105. Singer R. Introduction to epidemiology and causal inference. Presentation. Executive Veterinary Program. University of Illinois. 2014. 8 p. <http://vetmed.illinois.edu/wp-content/uploads/2015/10/6.-Module-2.1.pdf> (Address data 2019.01.25).
106. Hopkins WG. A new view of statistics. A scale of magnitudes for effect statistics. 2002. <http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html> (Address data 01.02.2019).
107. Saracci R. Epidemiology. A Very Short Introduction. – New York: Oxford University Press, Inc, 2010. 171 p.
108. Rothman KJ, Poole C. A strengthening programme for weak associations. *Int J Epidemiol.* 1988;17(4):955-9. DOI: 10.1093/ije/17.4.955.
109. Doll R. Cancer // In: Medical Surveys and Clinical Trials. Ed. by L.J. Witts. 2nd Edition. – London: Oxford University Press, 1964. P. 333.
110. Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med.* 1971;284(15):878-81. DOI: 10.1056/NEJM197104222841604.
111. Yang Q, Khoury MJ, James LM, et al. The return of thalidomide: are birth defects surveillance systems ready? *Am J Med Genet.* 1997;73(3):251-8.
112. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet.* 1981;2(8256):1129-33. DOI: 10.1016/S0140-6736(81)90585-7.
113. Ha M, Lee SY, Hwang SS, et al. Evaluation report on the causal association between humidifier disinfectants and lung injury. *Epidemiol Health.* 2016;38:Article e2016037. DOI: 10.4178/epih.e2016037.
114. Fedeli U, Girardi P, Gardiman G, et al. Mortality from liver angiosarcoma, hepatocellular carcinoma, and cirrhosis among vinyl chloride workers. *Am J Ind Med.* 2019;62(1):14-20. DOI: 10.1002/ajim.22922.
115. Lushnikov EF, Tsyb AF, Yamashita S. Thyroid cancer in Russia after Chernobyl. – Moscow: Meditsina, 2006. 128 p. (Russian. English abstract.)
116. Jacob P, Goulko G, Heidenreich WF, et al. Thyroid cancer risk to children calculated. *Nature.* 1998;392(6671):31-2. DOI: 10.1038/32076.
117. Belookaya TV, Korytko SS, Melnov SB. Medical effects of low doses of ionizing radiation. Mater. 4 Int. Congress on Integrat. Anthropology. – Saint Petersburg, 2002. P. 24-5. (Russian).
118. Hunter RJ, Jr, Shannon JH, Amoroso HJ. How to manage issues relating to the use of trial experts: standards for the introduction of expert testimony through judicial “Gate-

- Keeping” and scientific verification. *J Management and Strategy*. 2018;9(1):11. DOI: 10.5430/jms.v9n1p1.
119. Cole P. Causality in epidemiology, health policy and law. *Environmental Law Reporter*. 1997;27(6):10279-85.
120. Barnes DW. Too many probabilities: statistical evidence of tort causation. *Law and Contemporary Problems*. 2001;64(4):191-212. DOI: 10.2307/1192295.
121. Lagiou P, Adami HO, Trichopoulos D. Causality in cancer epidemiology. *Eur J Epidemiol*. 2005;20(7):565-74.
122. Lagiou P, Trichopoulos D, Adami HO. Concepts in Cancer Epidemiology and Etiology // In: *Textbook of Cancer Epidemiology*. 2nd Edition. Ed. by H.O. Adami, D. Hunter, D. Trichopoulos. – New York etc.: Oxford University Press, 2008. P. 127-52. DOI:10.1093/acprof:oso/9780195311174.003.0006.
123. Bae S, Kim HC, Ye B, Choi WJ, Hong YS, Ha M. Causal inference in environmental epidemiology. *Environ Health Toxicol*. 2017;32:Article e2017015. DOI: 10.5620/eh.t.e2017015.
124. Guzelian PS, Victoroff MS, Halmes NC, et al. Evidence-based toxicology: a comprehensive framework for causation. *Hum Exp Toxicol*. 2005;24(4):161-201. DOI: 10.1191/0960327105ht517oa.
125. Hollingsworth JG, Lasker EG. The Case against differential diagnosis: Daubert, medical causation. Testimony, and the scientific method. *J Health Law*. 2004;37(1):85-111.
126. Ferguson CJ. Is psychology research really as good as medical research? Effect size comparisons between psychology and medicine. *Rev Gen Psychol*. 2009;13(2):130-6. DOI: 10.1037/a0015103.
127. Koterov AN, Zharkova GP, Biryukov AP. Tandem of radiation epidemiology and radiobiology for practice and radiation protection. *Medical Radiology and Radiation Safety (Moscow)*. 2010; 55(5):48-73. (Russian. English abstract.)
128. Biryukov AP, Vasil'ev EV, Dumansky SM, Belyikh LN. Information-analytical support for radiation-epidemiological research activities. *Medical Radiology and Radiation Safety (Moscow)*. 2014; 59(6):34-42. (Russian. English abstract.)
- For citation:** Koterov AN, Ushenkova LN, Zubenkova ES, Wainson AA, Kalininna MV, Biryukov AP. Strength of Association. Report 1. Graduation of Relative Risk. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2019;64(4):5-17. (Russian). DOI: 10.12737/article_5d1adb25725023.14868717

А.А. Цишнатти^{1,2}, М.В. Пустовалова¹, А.К. Грехова¹, Ю.А. Бушманов¹, Т.А. Астрелина¹, И.В. Кобзева¹, В.А. Никитина¹, В.А. Брунчуков¹, Д.Ю. Усупжанова¹, И.М. Барабаш¹, Т.М. Блохина¹, Ю.А. Федотов¹, Н.Ю. Воробьева¹, А.С. Самойлов¹, А.Н. Осипов¹

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ В СВЕРХВЫСОКИХ ДОЗАХ НА КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ДВУНИТЕВЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ

1. Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва. E-mail: nuv.rad@mail.ru;
2. Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

А.А. Цишнатти – техник; М.В. Пустовалова – н.с., к.б.н.; А.К. Грехова – м.н.с., к.б.н.; Ю.А. Бушманов – зам. зав. отделом; Т.А. Астрелина – рук. центра биомедицинских технологий, д.м.н.; И.В. Кобзева – зав. криобанка, к.м.н.; В.А. Никитина – в.н.с., к.м.н.; В.А. Брунчуков – м.н.с.; Д.Ю. Усупжанова – м.н.с.; И.М. Барабаш – зав. отделением; Т.М. Блохина – н.с.; Ю.А. Федотов – н.с.; Н.Ю. Воробьева – зав. лаб., к.б.н.; А.С. Самойлов – генеральный директор, д.м.н., проф. РАН; А.Н. Осипов – зав. отделом, д.б.н., проф. РАН

Реферат

Цель: Провести сравнительную оценку влияния облучения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека в сверхвысоких дозах при температуре жидкого азота ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) и комнатной температуре ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$) на выход остаточных двунитевых разрывов (ДР) ДНК и на пролиферативную активность размороженных МСК.

Материал и методы: Выделение и культивирование МСК человека проводили по стандартной методике. Для криоконсервации клеток использовали диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрации 10 %. Для облучения клеток тормозным фотонным излучением с номинальной энергией фотонов 5 МэВ использовали ускоритель УЭЛР-10-100-Т-100 (Россия). Клетки облучали в дозах 50 и 500 Гр при температуре $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Выход остаточных ДР ДНК оценивали с помощью иммуноцитохимического анализа фокусов белка-маркера ДР – γH2AX . Для оценки пролиферативной активности анализировали долю Ki67 (белок-маркер клеточной пролиферации) позитивных клеток.

Результаты: Результаты оценки фокусов γH2AX в МСК через 48 ч после облучения в дозе 50 Гр показали, что количество остаточных фокусов γH2AX в ядрах МСК, облученных при температуре $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$, примерно в 3,2 раза ($p = 0,0002$) выше, чем в ядрах МСК, облученных при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Анализ пролиферативной активности клеток с использованием молекулярного маркера клеточной пролиферации белка Ki67 показал, что клетки, облученные в дозе 50 Гр при температуре $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$, полностью теряют способность к пролиферации. Пролиферативная активность клеток, облученных в той же дозе, но при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, существенно снижается, но часть клеток ($3,5\pm 1,1\%$) все же сохраняет способность к пролиферации. После облучения в дозе 500 Гр при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ клетки полностью теряют способность к пролиферации, но частично сохраняют способность к адгезии. Интегральная флуоресценция конъюгированных с флуорохромом антител к γH2AX ядер МСК человека, облученных в дозе 500 Гр при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, в 1,8 раза ниже, чем у ядер, облученных при температуре $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Заключение: Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что криоконсервированные МСК, облученные при температуре жидкого азота ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) в среде для консервации, содержащей 10 % ДМСО, могут переносить воздействие ИИ в больших дозах (до 50 Гр). Однако при этом наблюдается довольно высокий выход остаточных ДР ДНК и очень низкая пролиферативная активность, что делает их непригодными в клинической практике. Представляется перспективным использование количественного анализа фокусов γH2AX для оценки поврежденности генома и функционального состояния клеток, облученных при температуре жидкого азота.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, криоконсервация, двунитевые разрывы ДНК, клеточная пролиферация, тормозное излучение, сверхвысокие дозы

Поступила: 23.11.2018. Принята к публикации: 21.05.2019

Введение

Изучение эффектов воздействия ионизирующего излучения (ИИ) в криоконсервированных клетках, облученных при температуре жидкого азота ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), представляет интерес для понимания механизмов действия ИИ. При столь низкой температуре резко снижаются процессы диффузии молекул, что приводит к существенному увеличению времени жизни свободных радикалов [1, 2]. Свободные радикалы, образующиеся при радиолитическом разложении воды, оказываются пространственно «заперты» и не могут взаимодействовать с находящимися на расстоянии биологиче-

скими макромолекулами. Это дает уникальные возможности для детальных исследований механизмов прямого (поглощение энергии биологическими молекулами-мишенями) действия ИИ. С другой стороны, современные технологии криоконсервации позволяют хранить соматические и половые клетки в течение десятилетий. Футурологи обсуждают возможность хранения криоконсервированных клеток в течение сотен лет и даже тысячелетий для полетов к другим звездным системам. При этом возникают вопросы: какие максимальные дозы ИИ выдерживают криоконсервированные клетки, и к каким эффектам приводит

их облучение в больших дозах? Особый интерес для понимания механизмов повреждаемости криоконсервированных облученных клеток вызывают особенности образования критических радиационно-индуцированных повреждений ДНК – двуниевых разрывов (ДР). К сожалению, в открытой литературе отсутствуют данные как о количественном выходе ДР ДНК в клетках, облученных при температуре жидкого азота, так и об эффективности репарации этих повреждений после разморозки клеток.

Цель настоящей работы состояла в сравнительной оценке влияния облучения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека в сверхвысоких дозах при температуре жидкого азота ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) и комнатной температуре ($+22\text{ }^{\circ}\text{C}$) на выход остаточных ДР ДНК и на пролиферативную активность размороженных МСК.

Выбор МСК в качестве объекта исследований был обусловлен их широким использованием для клеточной терапии [3, 4]. При этом используются как свежесыведенные, так и криоконсервированные клетки.

Материал и методы

Выделение и культивирование клеток

Забор слизистой ткани у пациента проводили после подписания информированного согласия в стоматологическом отделении (протокол этического комитета ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России № 6А/08.02.2018). Для получения первичной культуры МСК проводили выделение клеток ферментативным методом с помощью коллагеназы 1 типа по описанному ранее методу [5]. Культивирование МСК проводили в CO_2 -инкубаторе при стандартных условиях ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$). Клетки культивировали до 6-го пассажа. При достижении 75–80 %-ного монослоя, клеточную культуру снимали с пластика ферментативным путем с помощью трипсин-ЭДТА. Осадок ресуспендировали в фосфатном буфере (PBS, Life Technologies, Gibco®, США), после чего производили подсчет количества жизнеспособных клеток. Проводили оценку уровня экспрессии поверхностных клеточных маркеров МСК на проточном цитофлюориметре BD FACS Canto II (Becton Dickinson Bioscience, США). Окрашивание клеток проводили моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромами CD45-FITC, CD73-PE, CD90-PE, CD105-APC, CD34-FITC, HLA-DR (BD Biosciences и Vesan Coulter, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Жизнеспособность оценивали с помощью красителя 7-ADD, проникающего через цитоплазматическую мембрану клетки и связывающегося с ДНК. Определяли количество CD45+ негативных 7-ADD позитивных клеток на проточном цитофлюо-

риметре FACSCanto II (Becton Dickinson CA, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Клетки пассировали на покровных стеклах в чашках Петри ($d = 35\text{ мм}$, Corning®, США) в 500 мкл клеточной суспензии из расчета 5×10^3 кл/см². Для адгезии клеток на стеклах культуральную среду (1,5 мл) добавляли через 15 мин после пассирования. Инкубация перед экспериментами проводилась в стандартных условиях ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$) в течение 24 ч.

Для эксперимента пробирки с МСК делились на 2 группы:

- 1) криоконсервированные МСК – 5 пробирок по 1 млн клеток в каждой;
- 2) нативные МСК – 5 пробирок по 1 млн клеток в каждой.

Криоконсервация

Пять пробирок, содержащих МСК по 1 млн клеток в каждой, криоконсервировали с криопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО) в концентрации 10 % в криопробирках объемом по 2 мл согласно общепринятой технологии криоконсервации [6].

Подготовленные образцы МСК помещали в промаркированные транспортные контейнеры: 1-й контейнер при температуре $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 2-й контейнер с жидким азотом при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ и облучали в дозах 50 и 500 Гр.

Облучение клеток

Для облучения клеток при температуре $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ использовали ускоритель УЭЛР-10-100-Т-100 (Россия). Ускоритель построен на базе ИЛУ 14 (импульсный линейный ускоритель) с энергией электронов до 10 МэВ и мощностью пучка до 100 кВт. Система конвертации пучка способна создать мощное поле тормозного фотонного излучения с максимальной энергией фотонов до 5 МэВ.

Для дозиметрии использовали пленочный детектор СО ПД(Ф)Р-5/50 – стандартный образец для измерения поглощенной дозы фотонного и электронного излучений (сополимер с феназиновым красителем). Стандартный образец представляет собой полимерную пленку однократного использования, изготовленного по ТУ 2379-006-13271746-00 «Пленка, окрашенная радиационно-чувствительная, типа ПОР». Относительная погрешность определения поглощенной дозы с помощью СО ПД(Ф)Р-5/50 не превышала 12 % ($p = 0,05$).

Разморозка и пассирование клеток

После облучения криоконсервированные клетки быстро размораживали в водяной бане при температуре $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$, помещали в культуральную среду для культивирования и пассировали на покровных стеклах в чашках Петри, как описано выше.

Иммуноцитохимические исследования

Клетки на покровных стеклах фиксировали параформальдегидом (4 % в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4) в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего дважды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4). Пермеабилizировали 0,3 % тритон-X100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 2 % бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания. Слайды инкубировали с первичными антителами (кроличьи моноклональные антитела к белку γ H2AX (клон EP854(2)Y, Merck-Millipore, США) в разведении 1/200 и мышиные моноклональные антитела к белку Ki67 (клон Ki-S5, Merck-Millipore, США) в разведении 1/400 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем слайды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с вторичными антителами IgG (H+L), конъюгированными с флуорохромами в виде антител козы к белкам мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США), в разведении 1/600 и антител козы к белкам кролика, конъюгированными с родамином (Merck-Millipore, США) в разведении 1/400 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина. Для окраски ДНК и предотвращения фотовыцветания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США).

Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенным видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (возбуждение 340–380 нм, эмиссия 435–485 нм), B-2E/C (возбуждение 465–495 нм, эмиссия 515–555 нм) и Y-2E/C (возбуждение 540–580 нм и эмиссия 600–660 нм). Анализировали не менее 200 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов использовали программу DARFI [7].

Статистический анализ

Статистический и математический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов \pm стандартная ошибка среднего. Для оценки значимости различий использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При анализе иммунофенотипа МСК с помощью проточной цитометрии во всех культурах клеток была выявлена высокая экспрессия маркеров МСК (CD73, CD90, CD105), маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного происхождения отсутствовали (CD34, CD45, HLA-DR). Иммунофенотип соответствовал требованиям Международной организации клеточной терапии, предъявляемым к МСК человека [8]. При дальнейших пассажах клетки в течение нескольких часов прикреплялись к пластику и сохраняли высокую пролиферативную активность и жизнеспособность ($98 \pm 1,2$ % 7-ADD) на протяжении всего периода культивирования.

Воздействие ИИ на живые клетки приводит к образованию целого спектра разнообразных повреждений ДНК, включая повреждения азотистых оснований, внутри- и межмолекулярные сшивки, одно- и двунитевые разрывы сахаро-фосфатного остова [9–11]. Считается, что именно ДР ДНК являются наиболее критическими для дальнейшей судьбы клетки [12]. ДР ДНК, отрепарированные некорректно, приводят к гибели клеток, клеточному старению или онкотрансформации [13, 14]. При этом репарация до 70–80 % радиационно-индуцированных ДР ДНК происходит с помощью относительно быстрого (до 4–6 ч), но некорректного механизма негомологичного воссоединения концов с частым образованием микроделеций и хромосомных перестроек. Оставшаяся часть ДР репарируется во время медленной фазы (от 4 до 24 ч) с участием корректного механизма гомологичной рекомбинации [15, 16]. Но даже через 24–72 ч остается от 5 до 10 % неотрепарированных ДР ДНК. Считается, что такие остаточные повреждения являются сложными и потенциально летальными [17].

В настоящей работе был сделан акцент на оценку именно таких остаточных ДР ДНК. Через 48 ч после облучения проводили количественный анализ остаточных ДР ДНК с помощью маркера – фокусов фосфорилированного гистона γ H2AX. Фосфорилирование H2AX осуществляется киназами ATM, ATR и DNA-PK в ответ на образование ДР, что свидетельствует о его распознавании [18].

На рис. 1 представлены результаты оценки фокусов γ H2AX в МСК через 48 ч после облучения в дозе 50 Гр при температуре -196 °C и $+22$ °C. Было показано, что количество остаточных фокусов γ H2AX в ядрах МСК, облученных при температуре $+22$ °C, примерно в 3,2 раза ($p = 0,0002$) выше, чем в ядрах МСК, облученных при температуре -196 °C. При этом количество остаточных фокусов γ H2AX в ядрах МСК, облученных при температуре -196 °C, статистически

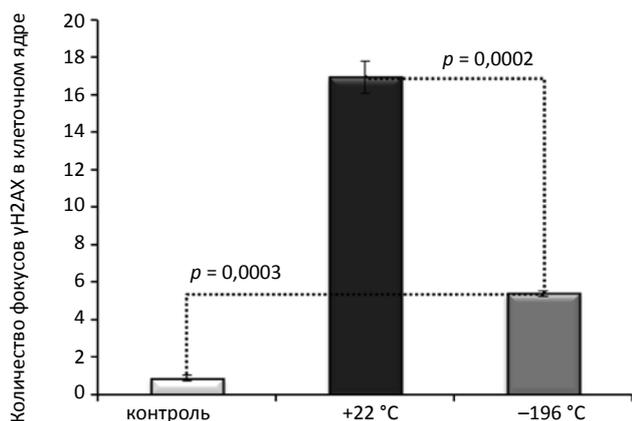


Рис. 1. Количество остаточных фокусов γH2AX в ядрах МСК человека через 48 ч после облучения в дозе 50 Гр при температурах +22 °C и -196 °C

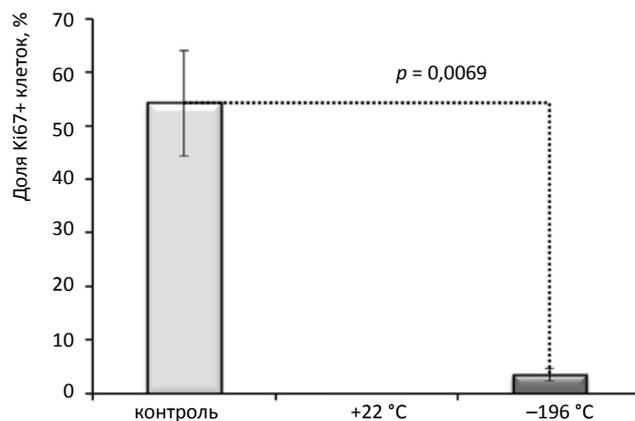


Рис. 2. Доля пролиферирующих (Ki67+) МСК человека через 48 ч после облучения в дозе 50 Гр при комнатной температуре (+22 °C) и температуре жидкого азота (-196 °C)

значимо выше контрольных значений (0,85±0,16 и 5,37±0,15 соответственно).

Анализ пролиферативной активности клеток с использованием молекулярного маркера клеточной пролиферации белка Ki67 показал, что клетки, облученные в дозе 50 Гр при температуре +22 °C, полностью теряют способность к пролиферации (рис. 2). Пролиферативная активность клеток, облученных в этой же дозе, но при температуре -196 °C, существенно снижается, но часть клеток (3,5±1,1 %) все же сохраняет способность к пролиферации. Обращает на себя внимание тот факт, что результаты оценки остаточных фокусов γH2AX полностью соотносятся с результатами оценки доли пролиферирующих клеток. Это свидетельствует о том, что остаточные фокусы γH2AX могут служить маркером клеточной сенесценции (потери способности клеток к делению).

Был проведен анализ остаточных фокусов γH2AX в ядрах криоконсервированных МСК через 48 ч после облучения в экстремальной дозе (500 Гр). На рис. 3 представлены микрофотографии иммуноцитохимически окрашенных ядер МСК после облучения в дозе 500 Гр при температурах +22 °C и -196 °C. Видно, что плотность посадки клеток, облученных при температуре +22 °C, очень низкая, а фокусы γH2AX сливаются, что делает невозможным подсчет их количества. В случае облучения при -196 °C клетки, хотя и полностью теряют способность к пролиферации, но сохраняют способность к адгезии, что отражается на плотности их посадки. Количество остаточных фокусов γH2AX велико, но они расположены отдельно, и практически не наблюдается их слияния, то есть их количество значительно меньше, чем в клетках, облученных при температуре +22 °C.

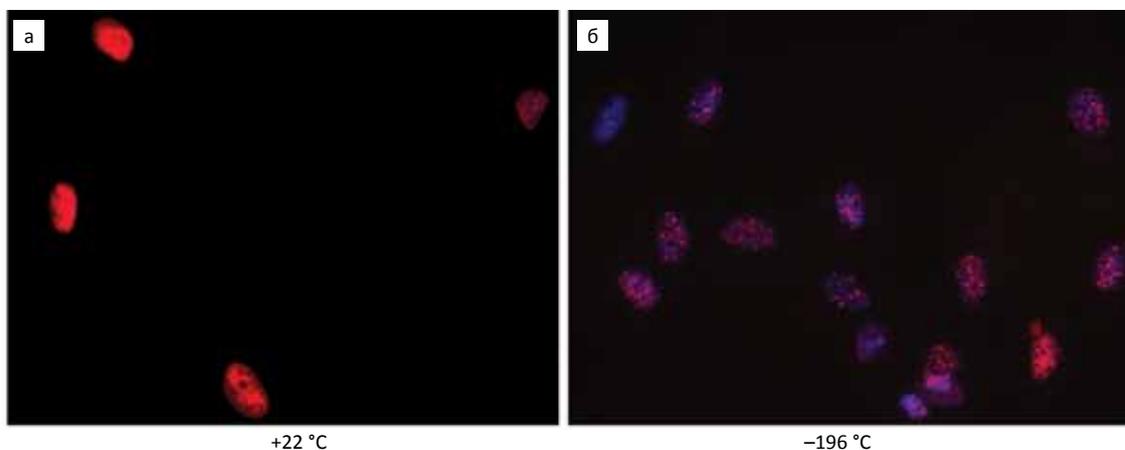


Рис. 3. Микрофотографии иммуноцитохимически окрашенных ядер МСК человека через 48 ч после облучения в дозе 500 Гр при комнатной температуре (+22 °C) и температуре жидкого азота (-196 °C). Синий – ДНК клеточного ядра, окрашенные DAPI. Красный – фокусы γH2AX

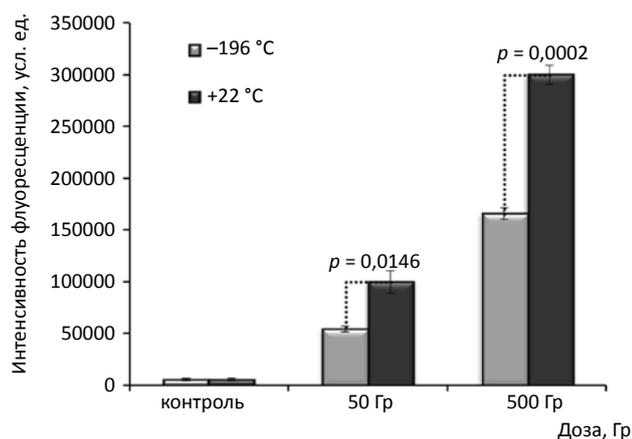


Рис. 4. Интегральная флуоресценция конъюгированных с флуорохромом антител к γ H2AX в ядрах МСК человека через 48 ч после облучения в дозе 50 Гр при температуре +22 °С и -196 °С

Для количественной оценки γ H2AX в клетках, облученных в дозе 500 Гр, была проведена оценка интегральной флуоресценции конъюгированных с флуорохромом антител к γ H2AX в клеточном ядре. Этот подход позволяет оценивать ДР ДНК в случае их большого количества и слияния фокусов γ H2AX. Дополнительно был произведен подсчет интегральной флуоресценции конъюгированных с флуорохромом антител к γ H2AX в клетках, облученных в дозе 500 Гр. Результаты, представленные на рис. 4, свидетельствуют о том, что интегральная флуоресценция конъюгированных с флуорохромом антител к γ H2AX ядер МСК, облученных при температуре -196 °С, в 1,8 раза ниже, чем у ядер, облученных при температуре +22 °С. Различия в коэффициентах, полученных при анализе количества фокусов γ H2AX, и их интегральной флуоресценции, объясняются тем, что при оценке интегральной флуоресценции большого количества фокусов происходит недооценка их количества, вследствие наложения сигналов от близлежащих фокусов.

При интерпретации результатов важно понимать, что образование радиационно-индуцированных ДР ДНК происходит как при прямом поглощении энергии молекулой ДНК, так и в случае образования двух одонитевых разрывов на антипараллельных нитях. При этом, одонитевой разрыв может быть образован как при прямом поглощении энергии одной нитью ДНК, так и в результате «атак» сахарофосфатного остова гидроксил-радикалом. Последний механизм образования одонитевых разрывов является доминирующим. Облучение МСК происходило в среде для криоконсервации, содержащей 10 % диметилсульфоксида (ДМСО). ДМСО является одновременно как

криопротектором [19], так и перехватчиком гидроксил-радикала [20]. Показано, что ДМСО снижает выход одонитевых разрывов ДНК примерно в 3 раза [21]. В нашем исследовании основные различия были в температуре, при которой облучались клетки. При -196 °С существенно снижается скорость радиационно-химических реакций, а основные процессы перехвата гидроксил-радикала ДМСО начинаются при разморозке клеток. По всей видимости, это сказывается на общем количестве образующихся в облученных клетках ДР ДНК.

Нами не изучалась гибель клеток, однако следует отметить, что в работе, выполненной еще в 1970-х гг. на фибробластах китайского хомячка, было показано, что гибель клеток, облученных рентгеновским излучением при -196 °С, примерно в 3,5 раза ниже, чем после облучения при комнатной температуре [2]. В обоих случаях клетки облучались в среде с 10 % ДМСО. При анализе остаточных фокусов γ H2AX МСК человека при температурах -196 °С и +22 °С был получен сходный коэффициент 3,2. По всей видимости, различия в процессах образования ДР ДНК являются ключевыми для понимания особенностей формирования радиобиологических эффектов в криоконсервированных клетках.

Заключен

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что криоконсервированные МСК, облученные при температуре жидкого азота (-196 °С) в среде, содержащей 10 % ДМСО, могут переносить воздействие ИИ в больших дозах. Небольшая часть криоконсервированных МСК, облученных в дозе 50 Гр, даже сохраняет способность к пролиферации ($3,5 \pm 1,1$ %). В размороженных после облучения в дозе 50 Гр и культивированных в течение 48 ч клетках выход остаточных, предположительно летальных, ДР ДНК был примерно в 3,2 раза ниже, чем в клетках, облученных в той же дозе и среде для консервации, но при температуре +22 °С. Представляется перспективным использование количественного анализа фокусов γ H2AX для оценки степени поврежденности генома и функционального состояния облученных криоконсервированных клеток.

Для цитирования: Цишнагги А.А., Пустовалова М.В., Грехова А.К., Бушманов Ю.А., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Никитина В.А., Брунчуков В.А., Усупжанова Д.Ю., И.М. Барабаш, Блохина Т.М., Федотов Ю.А., Воробьева Н.Ю., Самойлов А.С., Осипов А.Н. Влияние облучения в сверхвысоких дозах на криоконсервированные мезенхимальные стволовые клетки: двунитевые разрывы ДНК и пролиферативная активность // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 18–24.

DOI: 10.12737/article_5d11009f713799.54342353

Influence of Ultra-High Dose Radiation on Cryopreserved Mesenchymal Stem Cells: DNA Double-Strand Breaks and Proliferative Activity

**A.A. Tsishnatti^{1,2}, M.V. Pustovalova¹, A.K. Grekhova¹, Yu.A. Bushmanov¹, T.A. Astrelina¹,
I.V. Kobzeva¹, V.A. Nikitina¹, V.A. Brunchukov¹, D.Yu. Usupzhanova¹, I.M. Barabash¹,
T.M. Blokhina¹, Yu.A. Fedotov¹, N.Yu. Vorobyova¹, A.S. Samoylov¹, A.N. Osipov¹**

1. A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia. E-mail: nuv.rad@mail.ru;

2. National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia

A.A. Tsishnatti – Technician; M.V. Pustovalova – Researcher, PhD Biol.; A.K. Grekhova – Junior Researcher, PhD Biol.; Yu.A. Bushmanov – Deputy Head of Dep.; T.A. Astrelina – Head of the Center for Biomedical Technologies, Dr. Sci. Med.; I.V. Kobzeva – Head of the Center for Biomedical Technologies Cryobank, PhD Med.; V.A. Nikitina – Leading Researcher, PhD Med., ISCT member; V.A. Brunchukov – Junior Researcher; D.Yu. Usupzhanova – Junior Researcher; I.M. Barabash – Head of Dep.; T.M. Blokhina – Researcher; Yu.A. Fedotov – Researcher; N.Yu. Vorobyova – Head of Lab., PhD Biol.; A.S. Samoylov – Director General, Dr. Sci. Med., Prof. RAS; A.N. Osipov – Head of Dep., Dr. Sci. Biol., Prof. RAS

Abstract

Purpose: To conduct a comparative assessment of human mesenchymal stem cells (MSCs) exposed to ultrahigh doses of bremsstrahlung photon radiation at liquid nitrogen temperature (–196 °C) and room temperature (+22 °C) on the yield of residual DNA double-strand breaks (DSBs) and proliferative activity of thawed MSCs.

Material and methods: Isolation and cultivation of MSCs was carried out according to standard methods. Dimethyl sulfoxide (DMSO) at a final concentration of 10 % was used for cells cryopreservation. The cells were irradiated with bremsstrahlung photon radiation with photon nominal energy 5 MeV, using the UELR-10-100-T-100 accelerator (Russia). Cells were irradiated at the doses of 50 and 500 Gy at a temperature of +22 °C and –196 °C. The immunocytochemical analysis of γ H2AX foci (marker of DNA DSBs) was used for the assessment of the yield of residual DNA DSBs. The number of Ki67-positive cells (protein marker of cell proliferation) was analyzed for assessment of the cell proliferative activity.

Results: The results showed that 48 hours after irradiation of MSCs at a dose of 50 Gy the number of residual γ H2AX foci in the nuclei of MSCs irradiated at +22 °C was about 3.2 times ($p = 0.0002$) higher than in those irradiated at –196 °C. The analysis of the cell proliferative activity using Ki67 protein showed that cells irradiated at a dose of 50 Gy at a temperature of +22 °C completely lost their ability to proliferate. The proliferative activity of cells irradiated at the same dose, but at a temperature of –196 °C, was significantly reduced, but some of the cells (3.5 ± 1.1 %) still retained the ability to proliferate. After irradiation with a dose of 500 Gy at –196 °C, the cells completely lost their ability to proliferate, but partially retained the ability to adhere. The integral fluorescence of conjugated with the fluochrome γ H2AX foci in MSCs irradiated at a dose of 500 Gy at a temperature of –196 °C was 1.8 times lower than that in MSCs irradiated at a temperature of +22 °C.

Conclusion: The results of the study indicate that MSCs cryopreserved in a medium containing 10 % DMSO irradiated at liquid nitrogen temperature (–196 °C) can tolerate the effects of exposure to high doses (up to 50 Gy) of ionizing radiation. However, there is a rather high yield of residual DNA DSBs and a very low proliferative activity, which makes cells unsuitable for use in clinical practice. It seems promising to use a quantitative analysis of γ H2AX foci to assess genome damage and the functional state of cells irradiated in a cryopreserved state.

Key words: *mesenchymal stem cells, cryopreservation, DNA double-strand breaks, cell proliferation, bremsstrahlung, ultrahigh doses*

Article received: 23.11.2018. Accepted for publication: 21.05.2019

REFERENCES

1. Pezeshk A. The effects of ionizing radiation on DNA: the role of thiols as radioprotectors. *Life sciences*. 2004 Mar 26;74(19):2423-9. PubMed PMID: 14998719.
2. Ashwood-Smith MJ, Friedmann GB. Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time, and x-irradiation on mammalian cells preserved at –196 degrees in dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*. 1979 Apr;16(2):132-40. PubMed PMID: 573193.
3. Pustovalova M, Astrelina T, Grekhova A, Vorobyeva N, Tsvetkova A, Blokhina T, et al. Residual gammaH2AX foci induced by low dose x-ray radiation in bone marrow mesenchymal stem cells do not cause accelerated senescence in the progeny of irradiated cells. *Aging*. 2017 Nov 21;9(11):2397-410. PubMed PMID: 29165316. Pubmed Central PMCID: 5723693.
4. Pustovalova M, Grekhova A, Astrelina T, Nikitina V, Dobrovolskaya E, Suchkova Y, et al. Accumulation of spontaneous gammaH2AX foci in long-term cultured mesenchymal stromal cells. *Aging*. 2016 Dec 11; 8(12):3498-506. PubMed PMID: 27959319. Pubmed Central PMCID: 5270682.
5. Wang F, Yu M, Yan X, Wen Y, Zeng Q, Yue W, et al. Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. *Stem Cells and Development*. 2011 Dec; 20(12):2093-102. PubMed PMID: 21361847.
6. Haack-Sorensen M, Kastrop J. Cryopreservation and revival of mesenchymal stromal cells. *Meth. Mol. Biol.* 2011;698:161-74. PubMed PMID: 21431518.
7. Ozerov IV. Mathematical modeling of the double-strand DNA breaks induction and repair processes in mammalian cells under the rarely ionizing radiation action with different dose rates: PhD thesis of physics. Moscow. SRC – FMBC. 2015. (Russian).
8. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cel-*

- lular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. PubMed PMID: 16923606.
9. Kotenko KV, Bushmanov AY, Ozerov IV, Guryev DV, Anchishkina NA, Smetanina NM, et al. Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to gamma-radiation with different dose rates. *Int J Mol Sci*. 2013. Jul 01; 14 (7):13719-26. PubMed PMID: 23880845. Pubmed Central PMCID: 3742213.
 10. Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell*. 2007. Dec 14; 28 (5):739-45. PubMed PMID: 18082599. Epub 2007/12/18. eng.
 11. Osipov AN, Lizunova EY, Gur'ev DV, Vorob'eva NY. Genome damage and reactive oxygen species production in the progenies of irradiated CHO-K1 cells. *Biophysics*. 2011; 56 (5):931-5.
 12. Wang W, Li C, Qiu R, Chen Y, Wu Z, Zhang H, et al. Modelling of Cellular Survival Following Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks. *Sci Rep*. 2018 Nov 1;8(1):16202. PubMed PMID: 30385845. Pubmed Central PMCID: 6212584.
 13. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol*. 2016 Jan; 26(1):52-64. PubMed PMID: 26437586. Pubmed Central PMCID: 4862604.
 14. Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin Cancer Biol*. 2016 Jun; 37-38:51-64. PubMed PMID: 27016036.
 15. Shibata A. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks. *Mutation Res*. 2017 Oct; 803-805:51-5. PubMed PMID: 28781144.
 16. Shibata A, Jeggo PA. DNA double-strand break repair in a cellular context. *Clin Oncol*. 2014 May; 26(5):243-9. PubMed PMID: 24630811.
 17. Banath JP, Klokov D, MacPhail SH, Banuelos CA, Olive PL. Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC Cancer*. 2010 Jan 5; 10: 4. PubMed PMID: 20051134. Pubmed Central PMCID: 2819996.
 18. Osipov AN, Grekhova A, Pustovalova M, Ozerov IV, Eremin P, Vorobyeva N, et al. Activation of homologous recombination DNA repair in human skin fibroblasts continuously exposed to X-ray radiation. *Oncotarget*. 2015 Sep 29; 6 (29):26876-85. PubMed PMID: 26337087. Pubmed Central PMCID: 4694959.
 19. Lucas CC, Melo LR, de Sousa M, de Moraes GB, Martins MF, Xavier FAF, et al. Cryoprotectant agents and cooling effect on embryos of *Macrobrachium amazonicum*. *Zygote*. 2018 Apr; 26(2):111-8. PubMed PMID: 29655380.
 20. Smetanina NM, Pustovalova MV, Osipov AN. Effect of dimethyl sulfoxide on the extent of DNA single-strand breaks and alkali-labile sites induced by 365 nm UV-radiation in human blood lymphocyte nucleoids. *Radiation Biology. Radioecology*. 2014 Mar-Apr; 54(2):169-73. PubMed PMID: 25764818. (Russian).
 21. Osipov AN, Smetanina NM, Pustovalova MV, Arkhangelskaya E, Klokov D. The formation of DNA single-strand breaks and alkali-labile sites in human blood lymphocytes exposed to 365-nm UVA radiation. *Free Radical Biology & Medicine*. 2014 Aug; 73:34-40. PubMed PMID: 24816295.
- For citation:** Tsishnatti AA, Pustovalova MV, Grekhova AK, Bushmanov YuA, Astrelina TA, Kobzeva IV, Nikitina VA, Brunchukov VA, Usupzhanova DYu, Barabash IM, Blokhina TM, Fedotov YuA, Vorobyova NYu, Samoylov AS, Osipov AN. Influence of Ultra-High Dose Radiation on Cryopreserved Mesenchymal Stem Cells: DNA Double-Strand Breaks and Proliferative Activity. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2019;64(4):18-24. (Russian).
- DOI: 10.12737/article_5d11009f713799.54342353

В.К. Кузнецов, Н.И. Санжарова, А.В. Панов, Н.Н. Исамов**РАДИАЦИОННО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ АГРОЭКОСИСТЕМ В ЗОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АЭС: МЕТОДОЛОГИЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск. E-mail: vkuzn@yandex.ru

В.К. Кузнецов – в.н.с., д.б.н.; Н.И. Санжарова – директор, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН;

А.В. Панов – зам. директора, д.б.н., проф. РАН; Н.Н. Исамов – в.н.с., к.б.н.

Реферат

Цель: Обоснование необходимости создания и ведения системы радиационно-экологического мониторинга (РЭМ) аграрных экосистем в регионе размещения атомных электростанций на всех этапах жизненного цикла радиационно-опасного объекта.

Материал и методы: Представлены методологические подходы (санитарно-гигиенический и экологический) к РЭМ агроэкосистем в регионе размещения АЭС. Определены задачи РЭМ агроэкосистем, выделены этапы его организации и ведения. Показаны особенности разработки программ и регламентов РЭМ агроэкосистем. Определены основные объекты радиационно-экологического мониторинга, контролируемые параметры, а также периодичность мониторинговых наблюдений. Обоснованы принципы размещения контрольных пунктов в сети мониторинга.

Результаты: Представлены результаты РЭМ аграрных экосистем в зонах воздействия Курской и Ростовской АЭС за 2001–2016 гг. Продемонстрированы подходы к созданию сети мониторинга с учетом особенностей регионов размещения АЭС (ландшафтных, почвенных, хозяйственных). Показано, что плотность загрязнения сельскохозяйственных угодий ^{90}Sr варьирует в пределах 0,47–1,74 кБк/м², а ^{137}Cs – 2,7–9,7 кБк/м² для Курской АЭС и, соответственно, 0,36–2,57 по ^{90}Sr и 2,25–4,55 кБк/м² по ^{137}Cs – для Ростовской АЭС. За весь период мониторинговых наблюдений ни в одной из проб сельскохозяйственной продукции не обнаружены превышения санитарно-гигиенических нормативов по содержанию радионуклидов. За счет потребления продуктов питания, производящихся в 30-км зонах наблюдения, в рацион питания местного населения поступает около 63 Бк/год ^{90}Sr и 195 Бк/год ^{137}Cs в зоне наблюдения Курской АЭС и, соответственно, 133 и 184 Бк/год на прилегающей территории Ростовской АЭС, что почти в 400 раз по ^{137}Cs и в 10–20 раз по ^{90}Sr ниже соответствующих пределов годового поступления. Различия в накоплении радионуклидов для одной и той же культуры в разные годы наблюдений достигают 1,5 раз, что обусловлено влиянием почвенных и погодных условий, а также разными дозами внесения агроメリорантов под культуры.

Выводы: Результаты РЭМ агроэкосистем подтверждают, что эксплуатация Курской и Ростовской АЭС в штатном режиме не ведет к ухудшению радиационной обстановки в регионах их размещения. Дозовые нагрузки на местное население не превышают установленных нормативных значений. Система РЭМ агроэкосистем должна являться неотъемлемой составляющей в общей системе радиационной безопасности в регионах размещения АЭС и других радиационно-опасных объектов.

Ключевые слова: атомные электростанции, агроэкосистемы, радионуклиды, радиационно-экологический мониторинг, продукты питания, дозы облучения населения

Поступила: 19.11.2018. Принята к публикации: 21.05.2019

Введение

Развитие ядерной энергетики ставится мировой общественностью в прямую зависимость от решения вопросов обеспечения радиационной безопасности человека и окружающей среды. Во всех странах, располагающих ядерно-энергетическими установками, идет активное обсуждение путей развития атомной энергетики и проблем воздействия предприятий ядерно-топливного цикла на человека и биоту. В Российской Федерации определены перспективы развития энергетического комплекса страны в целом и создания новых АЭС на период до 2030 г. Планируется достройка возводимых атомных электростанций и освоение 10 новых площадок [1, 2]. При этом установленная суммарная мощность АЭС должна возрасти до 37–41 ГВт к 2020–2022 гг. и до 52–62 ГВт к 2030 г. Доля АЭС в общем объеме производства электроэнергии на этих этапах реализации энергетической стратегии должна составить 18,2–18,3 % и 19,7–19,8 % соответственно.

При работе АЭС в технологически штатном режиме влияние на человека и биоту оказывают как радиационные, так и нерадиационные факторы. При этом происходит поступление в окружающую среду некоторого строго контролируемого количества радионуклидов, которые включаются в пищевые цепочки миграции и формируют дополнительное к естественному фону облучение человека и живых организмов. Сельскохозяйственная продукция, производимая в регионе размещения АЭС, во всех случаях является одним из основных источников поступления радионуклидов и химических веществ в организм населения, проживающего на территориях, прилегающих к атомным электростанциям. Это обуславливает особое внимание к аграрным экосистемам, как объекту воздействия на человека предприятий ядерной энергетики [3, 4]. Учитывая, что в Российской Федерации в 30-км зонах влияния АЭС от 50 до 90 % территории занимают сельскохозяйственные угодья, становится очевидной необходимость организации системы ра-

диационно-экологического мониторинга (РЭМ) аграрных экосистем в регионах размещения АЭС как для обеспечения безопасного проживания населения, так и для обеспечения его продуктами питания, соответствующими санитарно-гигиеническим нормативам.

Разные стадии жизненного цикла АЭС (строительство, эксплуатация, вывод из эксплуатации) определяют не только различные масштабы воздействия на человека и окружающую среду, но и отличаются по действующим факторам, которые можно разделить на две группы – факторы нерадиационной природы и радиационные факторы. К нерадиационным факторам воздействия относятся: повышенное использование водных ресурсов (включая необходимость создания водоемов-охладителей), химическое загрязнение, выделение тепла, электромагнитное излучение, уровень шума и т.п. К радиационным факторам относятся: загрязнение техногенными радионуклидами (прежде всего, ^{137}Cs и ^{90}Sr) сельскохозяйственных угодий и продукции (растениеводства, кормопроизводства, животноводства), источников водоснабжения (питьевого, орошения и т.д.) за счет выбросов и сбросов АЭС, а также радиационное воздействие на сельскохозяйственные растения и животных и, в целом, на биоту. В период строительства АЭС основными факторами воздействия являются нерадиационные, включая, прежде всего, отчуждение сельскохозяйственных угодий и лесных массивов под площадку станции и инфраструктуру. При эксплуатации АЭС в штатном режиме влияние оказывают как радиационные, так и нерадиационные факторы. Поэтому систему РЭМ в регионе размещения АЭС следует создавать уже на стадии проектирования и строительства станции [5].

РЭМ в регионе размещения АЭС – это комплекс системных многолетних наблюдений за изменениями в окружающей среде, позволяющий выявить возможное влияние АЭС при нормальной эксплуатации и оценить текущий уровень ее экологической безопасности. Полученные в результате мониторинга данные должны быть достаточными для разработки управленческих решений по исключению либо снижению до уровня, определенного нормативными документами, возможного негативного влияния АЭС на человека и окружающую среду. В соответствии с [5], РЭМ в рамках инженерно-экологических изысканий на стадии разработки проектной документации и строительства необходимо проводить в пределах выбранной площадки размещения АЭС и в зоне наблюдения радиусом 30 км. Проведение РЭМ до начала строительства АЭС дает возможность оценить состояние всех экосистем, а также дозовых нагрузок на человека и биоту на уровне фона (так называемый «нулевой уровень»). Это важный этап, поскольку он создает информационную основу для дальнейшего анализа возможного негативного влияния станции на человека и окружающую среду в период строительства объекта

и его эксплуатации. Здесь важно отметить, что при оценке такого влияния необходимо учитывать уже существующее на момент строительства АЭС техногенное загрязнение окружающей среды от действующих промышленных предприятий в регионе размещения АЭС.

Методологические подходы к системе РЭМ агроэкосистем в регионах размещения АЭС

Основной целью РЭМ является обеспечение радиационной безопасности населения и требований нормативов, регламентирующих качество окружающей среды, а также выявление тенденций изменения радиационно-экологической обстановки в регионе размещения АЭС в процессе ее эксплуатации. При создании системы РЭМ агроэкосистем используют два методологических подхода: экологический и санитарно-гигиенический. Это обусловлено тем, что, с одной стороны, аграрные экосистемы формируются на основе природных факторов и имеют ряд общих характеристик с природными экосистемами и, соответственно, их можно характеризовать с экологических позиций. С другой стороны, агроценоз является начальным звеном пищевых цепочек, ведущих к человеку, что определяет необходимость нормирования воздействия на человека по санитарно-гигиеническому принципу [3].

Основными задачами РЭМ аграрных экосистем в регионе размещения АЭС являются:

- установление основных исходных хозяйственных и природных характеристик агроэкосистем (почвенные характеристики, уровень почвенного плодородия, продуктивность сельскохозяйственных растений и животных и др.), наблюдение и выявление тенденций в их изменении;
- регистрация текущих уровней техногенного загрязнения элементов агроэкосистем (почва, сельскохозяйственные растения и животные, продукция растениеводства, кормопроизводства и животноводства и др.), наблюдение и выявление тенденций в его изменении;
- установление приоритетных загрязнителей и значимости путей поступления радиоактивных и химических веществ в агроэкосистемы;
- получение исходных данных для выполнения прогнозных оценок экологического состояния окружающей среды с целью ограничения поступления радионуклидов в рацион питания населения и снижения дозовых нагрузок на человека;
- разработка рекомендаций по предупреждению и устранению возможных негативных тенденций в изменении окружающей среды и параметров агроэкосистем, обусловленных эксплуатацией АЭС.

Этапы организации РЭМ аграрных экосистем в регионе размещения радиационно-опасных объектов (рассматривая в первую очередь АЭС как наиболее

потенциально опасную, в случае аварии, составляющую ядерно-топливного цикла) включают:

- I. Составление перечня радиационно-опасных объектов.
- II. Анализ имеющихся данных о регламентированных сбросах и выбросах радиационно-опасных объектов, а также составление перечня радионуклидов, подлежащих контролю.
- III. Оценка существующих уровней радиоактивного загрязнения агроэкосистем в зоне размещения радиационно-опасных объектов.
- IV. Организация контрольных участков и контрольных пунктов по территориальному принципу с учетом многолетней розы ветров относительно площадки радиационно-опасного объекта.
- V. Разработка регламента РЭМ агроэкосистем при работе радиационно-опасного объекта в штатном режиме и при возможных аварийных ситуациях (включая проектные и запроектные аварии).

Для реализации программы РЭМ аграрных экосистем разрабатывается регламент его проведения, включающий:

- схему сети пунктов (точек) наблюдения с географической привязкой;
- перечень объектов РЭМ;
- наблюдаемые параметры;
- способы и процедуры определения контролируемых параметров (непосредственные измерения, отбор проб и т.п.);
- периодичность проведения наблюдений;
- методы анализа отобранных проб.

Выбор объектов для исследований проводят на основании анализа характеристик АЭС и характера использования прилегающей территории. В качестве основных объектов мониторинга агроэкосистем обычно выделяют: почвы сельскохозяйственных угодий; сельскохозяйственные растения; рационы кормления сельскохозяйственных животных; продукцию растениеводства; продукцию животноводства; воду, используемую для орошения сельскохозяйственных угодий и водопоя скота; удобрения и средства защиты растений; мелиоративные системы.

Контролируемые параметры включают: мощность эквивалентной дозы γ -излучения; агрохимические характеристики почв; продуктивность сельскохозяйственных растений и животных; содержание радионуклидов (естественных и техногенных) в почве; вертикальное распределение радионуклидов в профиле почв; содержание радионуклидов в продукции растениеводства; содержание радионуклидов в кормах и рационе сельскохозяйственных животных; содержание радионуклидов в воде водоемов, используемой для полива и водопоя скота; содержание радионуклидов в продукции животноводства.

В зависимости от сроков и периодичности выделяют следующие виды наблюдений: исходные – фиксируются уровни загрязнения и состояния агро-

экосистем на момент начала проведения мониторинга; плановые (периодические или сезонные) – проводятся в соответствии с регламентом мониторинга; внеплановые (оперативные) – проводятся в случае возникновения чрезвычайных ситуаций; сплошное обследование – проводится после радиоактивного загрязнения с целью определения зоны поражения (аварийное реагирование).

Схема размещения контрольных участков (точек, постоянных пробных площадок) разрабатывается на основании предварительной оценки характеристик АЭС с учетом возможного влияния ее предыдущей деятельности. Схема должна позволять проведение расширенных исследований воздействия на человека и окружающую среду каждого из источников – выбросов радионуклидов в атмосферный воздух, сбросов в поверхностные водоемы и мест хранения (захоронения) РАО. Схема также должна позволять оценивать по результатам мониторинговых исследований значимость всех путей облучения, связанных с каждым из источников воздействия. Для сопоставимости получаемых результатов рекомендуется каждый раз отбирать пробы и проводить измерения в одних и тех же местах. С этой целью после выбора местоположения контрольных точек и определения способов контроля рекомендуется провести объезд выбранных мест, во время которого окончательно определить привязки к местным ориентирам и составить описания каждой из точек. Такой подход позволяет расположить точки контроля в местах с наиболее характерными условиями местности и исключить пробоотбор (измерения) там, где это сделать невозможно или нецелесообразно.

При выборе контрольных участков на сельскохозяйственных угодьях обобщаются данные по почвенным характеристикам и структуре землепользования в хозяйствах. Анализируется информация о размещении полевых и кормовых севооборотов. Выделяют пахотные угодья, сенокосы и пастбища, с разделением последних на культурные угодья и естественные луга. Учитываются зональные особенности ведения земледелия, в частности, применение орошения. Для анализа миграции по животноводческой цепочке, как правило, выбирается молочно-товарная ферма, наиболее близко расположенная к радиационно-опасному объекту, и ферма, расположенная за пределами зоны контроля объекта [4].

На основании анализа результатов мониторинговых исследований составляют уточненную характеристику АЭС как источника воздействия на человека и окружающую среду, которая должна содержать сведения:

- о путях и уровнях облучения населения, реализующихся в результате текущей и предыдущей эксплуатации АЭС;
- о местах расположения критических территорий, типов почв, видов растений, производимой продук-

- ции сельского хозяйства в зоне наблюдения АЭС для каждого из видов воздействия, оказываемых текущей и предыдущей эксплуатацией АЭС;
- о наиболее загрязненных радионуклидами и тяжелыми металлами источниках хозяйственно-питьевого водоснабжения отдельно для каждого из типов используемой воды (вода поверхностных водоемов, грунтовая, артезианская);
 - об уровнях загрязнения радионуклидами и тяжелыми металлами объектов окружающей среды и пищевых продуктов, потребляемых населением в зоне наблюдения АЭС;
 - о вкладе в облучение населения зоны наблюдения и загрязнение территории каждого из радионуклидов, поступающих в окружающую среду в настоящее время, а также присутствующих в ней в результате предыдущей эксплуатации АЭС;
 - о местах расположения фоновых территорий для каждого из видов воздействия, оказываемых текущей и предыдущей эксплуатацией АЭС, а также другие сведения, характеризующие особенности распространения, накопления, миграции и трансформации радионуклидов в окружающей среде в зоне наблюдения АЭС.

Результаты и обсуждение

Разработанные методологические подходы апробированы и внедрены в практику при создании и ведении системы РЭМ аграрных экосистем в зонах воздействия Курской и Ростовской АЭС. Сети РЭМ агроэкосистем в регионе этих АЭС организованы с учетом места размещения и зоны возможного воз-

действия источника радиоактивного загрязнения, преимущественного направления «розы ветров» в весенне-летний период (период вегетации сельскохозяйственных культур и пастбищного содержания животных), характера существующего распределения радионуклидов по территории наблюдения в радиусе 30 км от АЭС, структуры землепользования, характеристик почвенного покрова, направленности отраслей сельскохозяйственного производства (животноводство, растениеводство). Для пространственной характеристики сельскохозяйственных земель разработаны карты-схемы размещения хозяйств в 30-км зонах Курской и Ростовской АЭС. Основными элементами, обеспечивающими наблюдение за уровнями загрязнения и состоянием аграрных экосистем, является сеть постоянных пробных площадок на сельскохозяйственных угодьях и контрольных пунктов на фермах (рис. 1). Организованная сеть наблюдений учитывает как ландшафтные, так и почвенные характеристики территории, включая специфику ведения сельского хозяйства. Контрольные участки выбирались таким образом, чтобы на почвах основных типов располагались наиболее распространенные в регионе сельскохозяйственные культуры и типичные севообороты.

При проведении РЭМ сельскохозяйственных угодий используются методы отбора, анализа и измерения проб, определенные в ведомственных, общегосударственных нормативных и методических документах, утвержденных в установленном порядке [3, 5–7].

В соответствии с регламентом мониторинга проводится определение следующих параметров радиа-

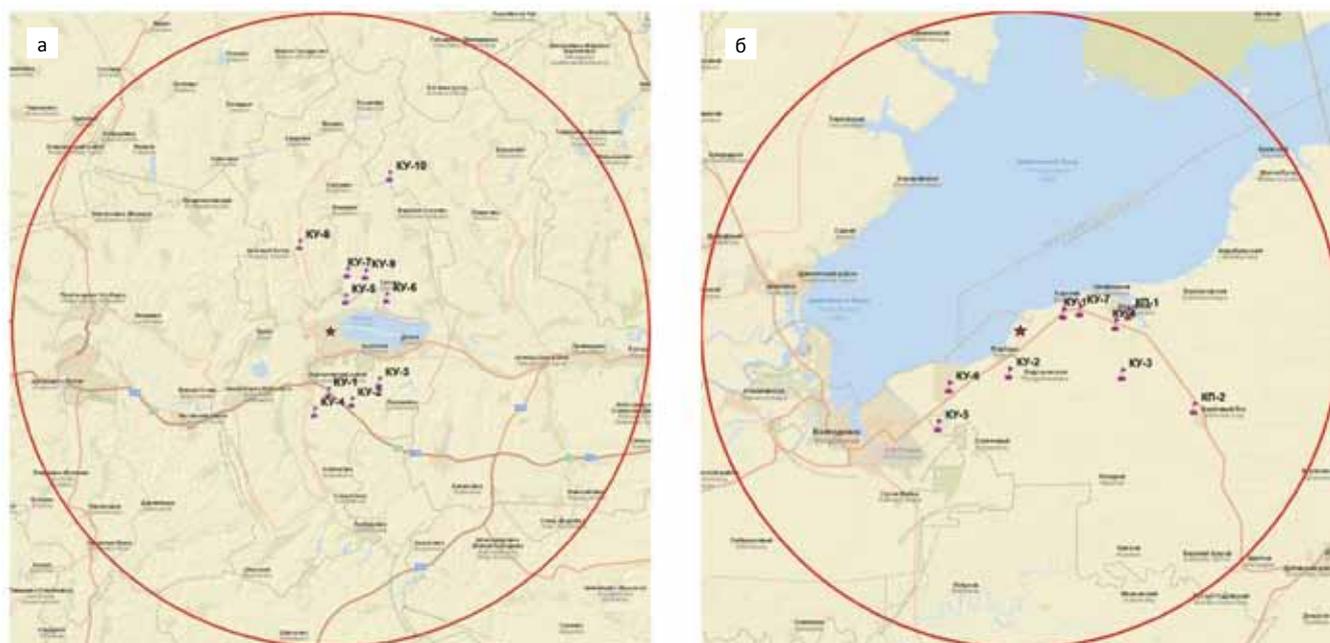


Рис. 1. Карты-схемы размещения контрольных участков и пунктов сети РЭМ агроэкосистем в 30-км зонах наблюдения Курской (а) и Ростовской (б) АЭС (* - площадка АЭС; КУ, КИ – контрольные пункты и участки)

Таблица 1

Коэффициенты перехода ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs из почвы в основные сельскохозяйственные культуры в регионах размещения Курской и Ростовской АЭС по данным мониторинга 2001–2016 гг., (Бк/кг)/(кБк/м²)

Культура	⁹⁰ Sr		¹³⁷ Cs	
	Мин.	Макс.	Мин.	Макс.
30-км зона наблюдения Курской АЭС				
Естественные травы	3,5	5,3	0,75	1,1
Кукуруза	1,1	1,7	0,25	0,35
30-км зона наблюдения Ростовской АЭС				
Многолетние сеяные травы	0,75	1,91	0,29	0,78
Естественные травы	0,81	2,2	0,28	0,86
Озимая пшеница, зерно	0,37	1,0	0,36	0,74
Ячмень, зерно	0,11	0,62	0,1	0,27
Картофель*	0,06	0,17	0,06	0,2
Томаты*	0,04	0,13	0,008	0,07
Капуста*	0,06	0,25	0,03	0,08

Примечание: * – данные по овощам представлены на сырой вес, остальные – на воздушно-сухой

ционно-экологической обстановки на сельскохозяйственных угодьях в 30-км зоне наблюдения АЭС:

- агрохимические свойства почв;
- измерение мощности эквивалентной дозы;
- содержание естественных и техногенных радионуклидов (⁹⁰Sr, ¹³⁷Cs, ²³²Th, ²²⁶Ra, ⁴⁰K, ⁷Be) в почвах, продукции растениеводства и животноводства;
- содержание химических элементов (в том числе тяжелых металлов) в почвах сельскохозяйственных угодий и в растительности (Co, Mo, Pb, Fe, Mn, Ni, Cu, Zn, Cd, Cr, Sr).

Исследования, проведенные в течение 2001–2016 гг., показали, что содержание радионуклидов в почвах зон наблюдения Курской и Ростовской АЭС характеризуется невысокой вариабельностью. Мощности эквивалентных доз на сельскохозяйственных угодьях находятся в диапазоне фоновых значений 0,08–0,14 мкЗв/ч. Плотность загрязнения сельскохозяйственных угодий ⁹⁰Sr колеблется в пределах от 0,47 до 1,74 кБк/м², а ¹³⁷Cs – от 2,7 до 9,7 кБк/м² для Курской АЭС и, соответственно, от 0,36 до 2,57 по ⁹⁰Sr и от 2,25 до 4,55 кБк/м² по ¹³⁷Cs – для Ростовской АЭС.

Различия в накоплении радионуклидов для одной и той же культуры в разные годы наблюдений достигали 1,5 раз, что обусловлено влиянием почвенных и погодных условий, а также разными дозами внесения агроメリорантов под культуры (табл. 1). Дополнительно отобранные пробы почв и овощных культур на частных подворьях и садовых участках позволили установить, что минимальными коэффициентами перехода (КП) радионуклидов характеризуются овощные культуры, а максимальными – многолетние травы. Различия в КП между этими видами культур достигают 50 раз, а в среднем составляют 10–

20 раз. Следует отметить, что переход ⁹⁰Sr из почв в сельскохозяйственные культуры в среднем в 2–5 раз выше по сравнению с ¹³⁷Cs.

За весь период мониторинговых наблюдений ни в одной из проб не было обнаружено превышения нормативов СанПиН 2.3.2.1078–01 и СанПиН 2.3.2.2650–10 по содержанию радионуклидов. За счет потребления продуктов питания, производимых в 30-км зонах наблюдения, в рацион питания местного населения поступает около 63 Бк/год ⁹⁰Sr и 195 Бк/год ¹³⁷Cs в зоне наблюдения Курской АЭС и, соответственно, 133 и 184 Бк/год для прилегающей территории Ростовской АЭС, что почти в 400 раз по ¹³⁷Cs и в 10–20 раз по ⁹⁰Sr ниже соответствующих пределов годового поступления (ПГП), установленных НРБ-99/2009 (табл. 2). При этом ожидаемая эффективная доза внутреннего облучения, обусловленная поступлением в организм ¹³⁷Cs и ⁹⁰Sr, за год составляет 2,5 и 5,0 мкЗв соответственно для Курской АЭС и 2,4 и 10,6 мкЗв/год для Ростовской АЭС. Основной вклад в формирование дозы внутреннего облучения населения от сельскохозяйственных продуктов, содержащих ¹³⁷Cs, вносят молоко (от 27,7 до 46,2 %), мясо (от 17,1 до 28,7 %), картофель и овощи (от 14,2 до 31,4 %), а содержащих ⁹⁰Sr – молоко (3,8–13,5 %), продукты растениеводства – до 75,8 %.

Уровни содержания радионуклидов в сельскохозяйственной продукции обусловлены радионуклидами как глобального происхождения, так и выбросами от АЭС. Выявление возможного вклада выбросов АЭС на фоне глобальных выпадений является сложной методической задачей из-за чрезвычайно низких

**Таблица 2
Среднегодовое поступление ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs с местными продуктами питания в рацион питания населения, проживающего в регионах размещения Курской и Ростовской АЭС по данным мониторинга 2001–2016 гг.**

Компоненты рациона питания населения	Поступление радионуклидов, Бк/год			
	Курская АЭС		Ростовская АЭС	
	⁹⁰ Sr	¹³⁷ Cs	⁹⁰ Sr	¹³⁷ Cs
Мясо (говядина)	0,5	56	0,3	31,5
Мясо (птица)	0,02	3,4	0,02	3,4
Молоко	8,5	90,3	5,0	51,0
Яйцо	0,004	0,04	0,004	0,04
Рыба	6,0	4,1	6,5	4,9
Картофель	15,5	8,0	22,4	42,0
Капуста	5,5	6,0	7,9	6,6
Огурцы, помидоры	8,5	7,3	23,1	9,24
Лук репка и зелень	2,2	3,0	–	–
Морковь, свекла	4,1	3,5	–	–
Хлеб	16,3	13,0	32,5	9,1
Крупа	–	–	35,0	26,2
Всего	67,1 (0,52 % от ПГП)	195,0 (0,25 % от ПГП)	132,7 (1,02 % от ПГП)	184,0 (0,24 % от ПГП)
ПГП с пищей	13000	77000	13000	77000

Таблица 3

Сравнительная оценка поступления ^{137}Cs в сельскохозяйственную продукцию от различных источников

Культура	Источник ^{137}Cs					
	Глобальные выпадения		Нормализованные выбросы Ростовской АЭС			
	Бк/кг		Бк/кг		% от глобальных выпадений	
	2001 г.	2031 г.	2001 г.	2031 г.	2001 г.	2031 г.
Пшеница озимая	0,55	0,18	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	0,18	0,61
Картофель	0,35	0,20	$0,45 \times 10^{-4}$	$0,57 \times 10^{-4}$	0,013	0,029
Молоко	0,5	0,2	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	0,22	0,55
Мясо	0,16	0,08	$4,6 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^{-3}$	2,9	5,9

концентраций радионуклидов, которые могут поступать в окружающую среду за счет эксплуатации АЭС. Вместе с тем, в настоящее время разработаны методы и модели для оценки последствий радиоактивного загрязнения окружающей среды.

При расчете поступления ^{137}Cs в сельскохозяйственную продукцию с использованием общей модели влияния выбросов и сбросов предприятий ядерно-топливного цикла на поступление радионуклидов в продукты питания населения, рекомендованной к использованию МАГАТЭ [8], было установлено, что при функционировании Ростовской АЭС в штатном режиме уровни содержания ^{137}Cs стационарного происхождения в сельскохозяйственной продукции на 2–3 порядка ниже по сравнению с глобальными выпадениями. Вклад нормализованных выбросов станции в суммарное поступление ^{137}Cs в продукцию растениеводства и животноводства составляет 0,013–2,9 % и через 30 лет функционирования АЭС увеличится до 0,029–5,9 % (табл. 3).

Динамика изменения валового содержания тяжелых металлов в почвах зон наблюдения Курской и Ростовской АЭС по годам исследования имеет низкую вариабельность, его величина находится в пределах фоновых значений и во всех случаях не превышает ПДК. При этом накопление тяжелых металлов в урожае сельскохозяйственных культур зависит не только от их содержания в почве, но и от видовых особенностей растений. Наиболее высокие концентрации химических элементов были обнаружены в кормовых культурах (естественные и сеяные травы), а минимальные концентрации зарегистрированы в овощах. При этом во всех случаях не отмечено превышения санитарно-гигиенических нормативов для продуктов питания.

Заключение

Результаты мониторинговых исследований позволяют сделать вывод о том, что эксплуатация Курской и Ростовской АЭС в штатном режиме не ведет к ухудшению радиационно-экологической обстановки в регионах размещения этих атомных электростанций.

При этом дозовые нагрузки на местное население за счет потребления им сельскохозяйственных продуктов, производящихся на сельскохозяйственных угодьях в 30-км зоне наблюдения, не превышают установленных нормативных значений.

Полученные результаты подтверждаются материалами федеральных и областных министерств, организаций и учреждений, участвующих в проведении радиационного и социально-гигиенического мониторингов [9–12]. По данным Центров гигиены и эпидемиологии в Курской и Ростовской областях за период наблюдения с 2011 по 2017 гг., превышений гигиенических нормативов содержания ^{137}Cs и ^{90}Sr в пищевых продуктах питания местного производства не обнаружено [11, 12].

Непрерывный мониторинг радиационно-гигиенической обстановки организациями различных ведомств в зонах наблюдения Курской и Ростовской АЭС показывает значения мощности эквивалентной дозы, не превышающие 0,08–0,14 мкЗв/ч, при норме до 0,3 мкЗв/ч, установленной «Основными санитарными правилами обеспечения радиационной безопасности» (ОСПОРБ-99/2010) [11, 13]. Вместе с тем, следует отметить, что вопросы оценки радиационно-экологической обстановки в регионах размещения радиационно-опасных объектов не могут быть решены только применением методов дистанционного мониторинга и требуют обязательного наземного обследования, что в целом способствует комплексному и всестороннему анализу и объективному прогнозу, на основании которого принимаются решения по оздоровлению экологической обстановки на территориях, прилегающих к АЭС, в том числе и в сфере сельскохозяйственного производства.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант №18-19-00016).

Для цитирования: Кузнецов В.К., Санжарова Н.И., Панов А.В., Исамов Н.Н. Радиационно-экологический мониторинг агроэкосистем в зоне воздействия АЭС: методология и результаты исследований // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 25–31.

DOI: 10.12737/article_5d1102809c5ac3.32613968

Radioecological Monitoring of Agroecosystems in the NPP Vicinity: Methodology and Results of Investigations

V.K. Kuznetsov, N.I. Sanzharova, A.V. Panov, N.N. Isamov

Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia. E-mail: vkkuzn@yandex.ru

V.K. Kuznetsov – Leading Researcher, Dr. Sci. Biol.; N.I. Sanzharova – Director, Dr. Sci. Biol., Prof., Corr. Member RAS;

A.V. Panov – Deputy Director, Dr. Sci. Biol., Prof. RAS; N.N. Isamov – Leading Researcher, PhD Biol.

Abstract

Purpose: Justification of the necessity to establish and maintain a system of radioecological monitoring of agricultural ecosystems in the vicinity of nuclear power plants at all stages of the life cycle of a radiation-hazardous facility.

Material and methods: The paper presents methodological approaches (sanitary-hygienic and environmental) to radioecological monitoring of agricultural ecosystems in the region of the NPP location. The tasks of the radioecological monitoring of agricultural ecosystems are defined, and its organisation and management stages are highlighted. The article displays the features of the development of programs and regulations of radioecological monitoring of agricultural ecosystems. The main objects of radioecological monitoring, parameters to be monitored, and also the frequency of monitoring observations are determined. The principles of locating the control points on the monitoring network are substantiated.

Results: The results of radioecological monitoring of agricultural ecosystems in the impact zones of the Kursk and Rostov NPPs are presented. The approaches to the creation of a monitoring network, taking into account the peculiarities of the regions of the NPPs' location (landscape, soil, economic), are demonstrated. It is shown that the contamination density of agricultural lands by ^{90}Sr varies in the range of 0.47–1.74 kBq/m², and by ^{137}Cs – 2.7–9.7 kBq/m² for Kursk NPP and, for Rostov NPP it is 0.36–2.57 kBq/m² by ^{90}Sr and 2.25–4.55 kBq/m² by ^{137}Cs . Over the entire period of monitoring observations, none of the samples of agricultural products appeared to have an excess of sanitary and hygienic standards for the content of radionuclides. Due to the consumption of food produced in 30-km observation zones, about 63 Bq/a of ^{90}Sr and 195 Bq/a of ^{137}Cs in the Kursk NPP observation zone and, respectively, 133 and 184 Bq/a in the vicinity of Rostov NPP enter the diet of the local population, which is almost 400 times for ^{137}Cs and 10–20 times for ^{90}Sr below the annual ingestion limits respectively. Differences in the accumulation of radionuclides for the same crop in different years of observation come up to 1.5 times, due to the influence of soil and weather conditions, as well as different doses of ameliorants application.

Conclusion: The results of the radioecological monitoring of agricultural ecosystems confirm that the operation of the Kursk and Rostov NPPs in normal mode does not lead to a deterioration of the radiation situation in the regions where they are located. Radiation doses on the local population do not exceed the established standard values. The system of radioecological monitoring of agricultural ecosystems should be an integral component in the general system of radiation safety in the vicinities of NPPs and other radiation-hazardous facilities.

Key words: Nuclear Power Plants, agroecosystems, radionuclides, radioecological monitoring, foodstuffs, exposure doses of population

Article received: 19.11.2018. Accepted for publication: 21.05.2019

REFERENCES

- Conceptual provisions of the strategy for the development of nuclear energy in Russia in the XXI century. Moscow. NIKIAT; 2012. 62 p. (Russian).
- Russia's energy strategy until 2030 (approved by the decree of the Government of the Russian Federation of November 13. 2009 No. 1715-r). (Russian).
- Organization of state radioecological monitoring of agroecosystems in the zone of exposure to radiation-hazardous objects. MU-13.5.13-00. (approved by the Ministry of Agriculture of the Russian Federation on August 7, 2000). Moscow. 2000. 28 p. (Russian).
- Methods of organizing and conducting agroecological monitoring of agricultural land in areas of industrial pollution and the assessment of the environmental situation in agriculture in the regions where nuclear power plants are located and the Chernobyl NPP accident. Ed. by N.I. Sanzharova. Obninsk: VNIISHRAE. 2010. 276 p. (Russian).
- Engineering surveys for the location, design and construction of nuclear power plants. Part II. Engineering surveys for the development of design and working documentation and maintenance of construction. SP 151.13330.2012. Moscow. 2013. 155 p. (Russian).
- Guidelines for conducting local monitoring at reference sites. 1996. Moscow. CINA0. 1996. 16 p. (Russian).
- Sanitary rules for the design and operation of nuclear power plants. SanPiN 2.6.1.24–03. 2003 (approved by the decision of the Ministry of Health of the Russian Federation of April 28, 2003 No. 69). (Russian).
- Generic Models for Use in Assessing the Impact of Discharges of Radioactive Substances to the Environment. Safety Rep. Ser. N19. Vienna: IAEA, 2001. 216 p.
- Data on radioactive contamination of the territory of populated areas of the Russian Federation with cesium-137, strontium-90 and plutonium-239 + 240. 2015. Ed. by S.M. Vakulovsky. Obninsk, "Typhoon". 2016. 225 p. (Russian).
- Report "On the state and protection of the environment in the territory of the Kursk region in 2015". 2016. Kursk, Administration of the Kursk Region. 2016. 126 p. (Russian).
- Report "On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population of the Rostov region in 2017". Rostov-on-Don, Administration of the Rostov Region. 2018. 197 p. (Russian).
- Materials of the state report "On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Kursk region in 2015". 2016. Kursk, Administration of the Kursk Region. 2016. 280 p. (Russian).
- Radiation situation on the territory of Russia and neighboring countries. 2014. Obninsk, "Typhoon". 2014. 367 p. (Russian).

For citation: Kuznetsov VK, Sanzharova NI, Panov AV, Isamov NN. Radioecological Monitoring of Agroecosystems in the NPP Vicinity: Methodology and Results of Investigations. Medical Radiology and Radiation Safety. 2019;64(4):25-31. (Russian).

DOI: 10.12737/article_5d1102809c5ac3.32613968

**М.В. Халюзова¹, М.М. Цыганов², Д.С. Исубакова^{1,2}, Е.В. Брониковская¹, Т.В. Усова¹,
Н.В. Литвяков^{1,2,4}, А.Б. Карпов^{1,3}, Л.Р. Тахауова³, Р.М. Тахауов^{1,3}**

ПОЛНОГЕНОМНОЕ АССОЦИАТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ С ПОВЫШЕННОЙ ЧАСТОТОЙ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У ЛИЦ, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ДЛИТЕЛЬНОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

1. Северский биофизический научный центр ФМБА России, Северск;
2. Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Томск;
3. Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск;
4. Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск. E-mail: mail@sbrsc.seversk.ru

М.В. Халюзова – н.с.; М.М. Цыганов – н.с., к.б.н.; Д.С. Исубакова – м.н.с.; Е.В. Брониковская – м.н.с.; Т.В. Усова – м.н.с.; Н.В. Литвяков – зав. лаб., д.б.н.; А.Б. Карпов – рук. отдела, д.м.н., проф.; Л.Р. Тахауова – студентка; Р.М. Тахауов – директор, д.м.н., проф.

Реферат

Цель: Полногеномное исследование связи 750 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) с повышенной частотой различных типов хромосомных aberrаций, возникших у работников радиационно опасного производства, под действием хронического облучения в диапазоне доз 100–300 мЗв.

Материал и методы: Объектом исследования служили пробы крови 37 работников Сибирского химического комбината. Средняя суммарная доза внешнего облучения обследованных лиц составила $188,8 \pm 8,3$ мЗв, медиана – 185 мЗв, интерквартильный размах – 147,8–218,7 мЗв, мин. – 103,4 мЗв, макс. – 295,8 мЗв. Генотипирование образцов ДНК лейкоцитов крови работников проводили на микроматрицах высокой плотности CytoScan™ HD Array (фирма Affymetrix, США), содержащих более 750 тыс. SNPs всех генов OMIM и межгенных областей. У всех обследованных был проведен стандартный цитогенетический анализ и определена частота aberrантных клеток, парных фрагментов, кольцевых и дицентрических хромосом, хроматидных фрагментов и хроматидных обменов.

Результаты: Установлено, что с учетом поправки Бонферрони имеются только статистически значимые связи SNPs с частотой aberrантных клеток, все остальные типы хромосомных aberrаций не показали статистической значимости. С повышенной частотой aberrантных клеток, возникающих под действием хронического облучения, ассоциировано 8 SNPs (rs10779468, rs158735, rs158710, rs158712, rs11131536, rs528170, rs9533572, rs10512439). Четыре межгенных SNPs (rs10779468, rs158735, rs158710, rs158712) в длинном плече 1-й хромосомы, по-видимому, находятся в важном регуляторном регионе (1:222282882–1:222402787). Интронные полиморфизмы (rs528170, rs9533572, rs10512439) принадлежат генам *PACRG*, *ENOX1*, *MYO1D*, и на эти гены следует обратить пристальное внимание как на новых участников генетической детерминации индивидуальной радиочувствительности.

Заключение: Обнаруженные полиморфные варианты, минорные генотипы которых ассоциированы с повышенной частотой aberrантных клеток у работников Сибирского химического комбината, подвергавшихся радиационному воздействию в дозе 100–300 мЗв, можно рассматривать в качестве потенциальных маркеров индивидуальной радиочувствительности. Для подтверждения выявленных ассоциаций необходимы дальнейшие валидационные исследования на расширенной выборке людей, подвергавшихся радиационному воздействию.

Ключевые слова: индивидуальная радиочувствительность, внешнее γ -облучение, длительное радиационное воздействие, полиморфизм генов, хромосомные aberrации

Поступила: 10.10.2018. Принята к публикации: 21.05.2019

Введение

За последние годы было проведено множество научных исследований генома в рамках проектов GWAS (genome-wide association studies – полногеномный поиск ассоциаций). Основная цель GWAS состоит в поиске различных генетических маркеров, прежде всего SNPs (single-nucleotide polymorphisms – однонуклеотидных полиморфизмов), определяющих генетическую индивидуальность человека, ассоциированных с риском развития различных патологических состояний, с помощью которых можно предиктивно оценить вероятность развития того или иного заболевания, спрогнозировать течение болезни, а также разработать новые стратегии профилактики и лечения [1]. Поиск связей между SNPs и различными заболеваниями человека, такими как злокачественные новообразования, болезни сердечно-сосудистой системы,

диабет, аутоиммунные заболевания и психические расстройства, находит широкое применение в современной науке [1]. GWAS может использоваться также с целью изучения сложных фенотипических признаков в популяции, в том числе, таких как индивидуальная чувствительность к факторам окружающей среды.

Одним из критичных и наиболее изучаемых факторов внешней среды является ионизирующее излучение (ИИ). Воздействуя на клетку, ИИ вызывает серьезные повреждения, ведущие к развитию мутационных эффектов и гибели клетки. Самым распространенным индикатором действия ИИ до сих пор остается индукция нестабильных хромосомных aberrаций (ХА). В этой связи, основными показателями оценки индивидуальной чувствительности организма к радиации (ИРЧ – индивидуальной радиочувствительности) считают уровни индуцированных ХА у пациентов, а так-

же выход радиационно обусловленных заболеваний, прежде всего, злокачественных новообразований [2].

Исследования, направленные на поиск молекулярно-генетических маркеров индукции ХА при радиационном воздействии, до недавнего времени ограничивались исключительно кандидатным подходом. Данные по связи отдельных SNPs кандидатных генов с повышенной частотой ХА во многом противоречивы, в связи с чем необходимо проведение метаанализов для их подтверждения [3–8].

В связи с тем, что кандидатный подход поиска маркеров ИРЧ не оправдал себя, в 2009 г. был создан Radiogenomics Consortium (RGC), куда вошли ученые из 20 стран мира. Основной задачей организации является содействие крупномасштабным исследованиям, направленным на выявление молекулярно-генетической природы генотоксичности ИИ [9]. При поддержке RGC был проведен ряд метаанализов, направленных на валидацию ранее опубликованных данных [10, 11], а также проведено несколько полногеномных поисков маркеров генотоксичности лучевой терапии у онкологических больных.

В серии таких исследований, проведенных Kerns S.L. et al. (2010, 2013) на больных раком предстательной железы, получавших лучевую терапию, были установлены следующие ассоциации: с проявлениями эректильной дисфункции после лечения (12 SNPs); с затруднением мочеиспускания спустя 2–3 года после прекращения лучевой терапии (8 SNPs гена *IFNK*); с ректальным кровотечением (rs7120482 и rs17630638) [12–15]. С использованием технологии Axiom Genome-Wide CEU 1 array (Affymetrix), включающей в себя 552 597 SNPs, на 741 онкологическом больном был идентифицирован ген *TANC1*, полиморфизмы которого ассоциированы с проявлениями поздней токсичности лучевой терапии [16]. Самое крупное на данный момент исследование было проведено с помощью микроматрицы Illumina CytoSNP12 array (249 679 SNPs) для 1850 пациентов (1217 – больных раком молочной железы, 633 – раком предстательной железы), получавших лучевую терапию. Спустя 2 года после ее прекращения было установлено 19 полиморфизмов, ассоциированных с различными лучевыми реакциями у больных раком молочной железы и 20 SNPs у больных раком предстательной железы [17].

Следуя необходимости проведения широкомасштабных исследований по оценке ИРЧ, нами в 2011 г. было проведено микроматричное исследование связи полиморфизмов с повышенной частотой и типом ХА как индикаторов повышенной ИРЧ у здоровых работников Сибирского химического комбината, подвергавшихся профессиональному радиационному воздействию в дозах 100–300 мЗв. Именно при дозах этого диапазона на дозовой кривой наблюдается плато, когда частота ХА с увеличением дозы не возрастает [18]. Генотипирование образцов ДНК 96 работ-

ников проводили на олигонуклеотидном микрочипе Cancer_SNP_Panel GTT177211 (Illumina), содержащем 1421 SNPs-маркер 406 генов. В результате было установлено 40 SNPs, ассоциированных с частотой различных типов ХА, из них 24 SNPs были сопряжены более чем с одним типом ХА [19]. Дальнейшие валидационные исследования на больших выборках позволили подтвердить обнаруженные ассоциации с повышенной частотой дицентрических хромосом для 9 SNPs и с повышенной частотой кольцевых хромосом для 14 SNPs [20].

Для расширения исследований, направленных на идентификацию молекулярно-генетических маркеров ИРЧ, было принято решение об увеличении числа исследуемых полиморфизмов в полногеномном формате (GWAS). Первые результаты, полученные на 37 работниках, подвергавшихся длительному профессиональному радиационному воздействию, приводятся в настоящей работе. Для анализа ассоциаций SNPs с частотой ХА использовали микроматрицы высокой плотности CytoScan™ HD Array (фирма Affymetrix, США), которые содержат более 750 тыс. SNPs, охватывающих все гены OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man – Менделеевское наследование у человека) и некоторые межгенные участки.

Материал и методы

Объектом для исследования служили пробы крови 37 здоровых работников Сибирского химического комбината (СХК) – в недавнем прошлом одного из крупнейших в мире предприятия атомной отрасли, подвергавшихся долговременному радиационному воздействию (γ -облучение) в процессе профессиональной деятельности в дозах от 100 до 300 мЗв. Средняя суммарная доза внешнего облучения обследованных лиц составила $188,8 \pm 8,3$ мЗв, медиана – 185 мЗв, интерквартильный размах – 147,8 – 218,7 мЗв, мин. – 103,4 мЗв, макс. – 295,8 мЗв. Данные об индивидуальных дозах γ -излучения, измеренных с помощью фотоплочных и термомлюминесцентных дозиметров, были получены из отдела охраны труда, ядерной и радиационной безопасности СХК (индивидуальный дозиметрический контроль персонала проводился с момента ввода в действие основных технологических процессов с 1953 г.). Средний возраст обследованных лиц составил $67,3 \pm 1,2$ лет (минимальный – 57 лет, максимальный – 78 лет). Источником медицинской информации являлся архив Северского биофизического научного центра ФМБА России [21].

Кровь брали из локтевой вены утром натощак в стерильные контейнеры Vacuette с гепарином и с EDTA. Кровь с гепарином использовали для стандартного цитогенетического анализа, из крови с EDTA выделяли ДНК для последующего микроматричного

анализа. В соответствии с действующими международными нормами и с разрешения локального этического комитета Северского биофизического научного центра ФМБА России у всех работников СХК, участвующих в данном исследовании, было получено информированное согласие.

ДНК из крови выделяли при помощи набора QIAamp DNA Blood mini Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию и чистоту выделения ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США). Концентрация составила от 50 до 150 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 2,10-2,35$, $A_{260}/A_{230} = 2,15-2,40$. Целостность ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США) с использованием набора Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide (Agilent Technologies, США). Фрагменты ДНК в основном имели массу более 48 кбр. Выделенная ДНК хранилась при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в низкотемпературном морозильнике Sanyo (Япония) и использовалась для микроматричных исследований.

Для всех обследованных лиц проводили стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови. Для постановки культуры использовали цельную кровь, которую смешивали с культуральной средой и инкубировали в культуральных флаконах при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в суховоздушном термостате. Подробно методика описана в статье 2014 г. [18]. Хромосомный анализ осуществляли с помощью микроскопа Leica DM2500 (Германия). У каждого индивида обследовали не менее 300 метафаз и выражали в виде частоты на 100 метафаз. Анализировали все виды ХА, распознаваемых без кариотипирования: aberrantные клетки, парные фрагменты, кольцевые и дицентрические хромосомы, хроматидные фрагменты. Также учитывали хроматидные обмены (фигуры типа «крест»).

Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности CytoScan™ HD Array (фирма Affymetrix, США). Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® SCNAner 3000 7G (Affymetrix, США). Для обработки результатов микрочипирования использовали программу Chromosome Analysis Suite 3.1 (Affymetrix, США), которая разработана специально для анализа результатов исследований на матрице CytoScan™ HD Array.

Для выборок вычислялись M – среднее арифметическое и m – стандартная погрешность средней. Для сравнения групп использовали непараметрический критерий Вилкоксона – Манна – Уитни с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc, США).

Ассоциацию уровня ХА с SNPs оценивали с использованием языка программирования R в про-

грамме R version 3.0.2 (<https://www.r-project.org/foundation/>). Анализ данных выполнялся по логлинейной регрессии (для признаков с непрерывной изменчивостью) для всех четырех генотипических моделей (кодминантной, доминантной, рецессивной и сверхдоминантной) на каждый из исследуемых SNPs. Рецессивная генотипическая модель была выбрана согласно информационному критерию Акаике. По рецессивной модели наследования оценивались различия в частоте ХА между носителями «дикого» + гетерозиготного против мутантного генотипов. Для коррекции уровней доверительной вероятности на множественные сравнения использовалась поправка Бонферрони. Для уточнения и идентификации номеров SNPs и генов, к которым они принадлежат, в работе была использована база данных Affymetrix DataBases genotypes (<http://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/>), NCBI (National Center for Biotechnological Information – Национальный центр биотехнологической информации (США)) и OMIM. Для анализа неравновесия по сцеплению использовали программу SNPalyze (Dynacom, Иокогама, Япония).

Расчет и последующий анализ ассоциации уровня ХА в лимфоцитах крови облученных работников СХК с SNPs осуществляли с использованием программы R version 3.0.2. Эта программа предназначена для статистической обработки большого массива данных, содержит общий пакет статистического анализа и специально загружаемый пакет типа Genetics.

Результаты и обсуждение

На первом этапе результаты анализа сравнивали с референсной последовательностью. Для каждого из 37 работников были установлены генотипы («дикий», мутантный или гетерозиготный) по 750 тыс. полиморфных вариантов 12 тыс. генов из базы OMIM и некоторых межгенных участков с неизвестными пока функциями. Была составлена таблица генотипов всех 750 тыс. выбранных SNPs (173 Мб). Для дальнейшего биоинформационного анализа была прописана последовательность команд (скрипт), содержащая в себе команды форматирования данных и расчета. Создание и редактирование скрипта осуществлялось с помощью программы Tinn-R Editor (GUI for R Language and Environment, Version 3.0.2.2). Всего в анализ было включено 749 157 SNPs.

В первую очередь, из представленного массива данных были исключены SNPs с частотами генотипов, не соответствующими ожидаемым при равновесии Харди – Вайнберга ($p < 0,01$). Далее были удалены все мономорфные SNPs (все 37 работников имели 1 генотип). Для исключения эффекта малых выборок из анализа были исключены SNPs с частотами мутантного генотипа менее пяти. Данный параметр был по-

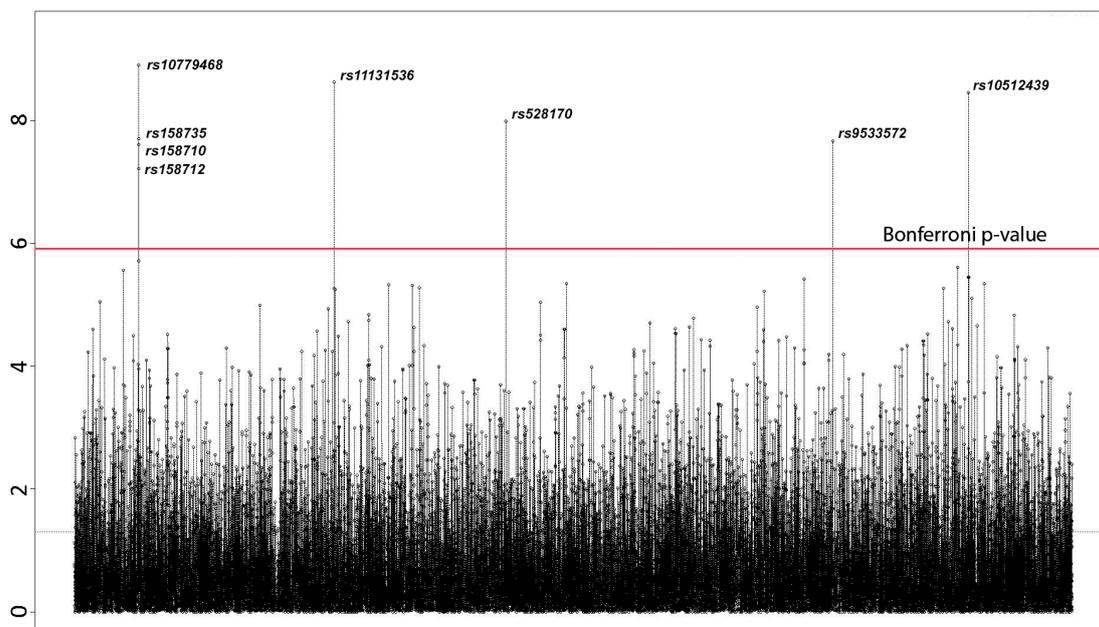


Рис. 1. Уровни значимости лог-линейной регрессии для рецессивной модели по частоте aberrantных клеток. По оси ординат – значение уровня p в логарифмических координатах $-(\log_{10})$, красная линия – уровень поправки Бонферрони

добран эмпирически для исключения эффекта малых выборок.

В итоге из всего массива полиморфизмов осталось 40 089 SNPs. После форматирования были прописаны специализированные команды для анализа связи полиморфных вариантов с повышенным уровнем ХА в лимфоцитах крови работников СХК (aberrantных клеток, хромосомных и хроматидных фрагментов, дицентриков, кольцевых хромосом и хроматидных обменов). Расчет уровня доверительной вероятности был сделан для рецессивной генотипической модели: мутантный генотип против гетерозиготного + «дикого»

генотипов по лог-линейной регрессии. Для коррекции доверительной вероятности на множественные сравнения использовалась поправка Бонферрони. Для 40 089 SNPs была изучена связь с частотой aberrantных клеток, парных фрагментов, хроматидных фрагментов, хроматидных обменов, дицентрических и кольцевых хромосом. С учетом поправки Бонферрони статистическую значимость имела только связь SNPs с частотой aberrantных клеток. На рис. 1 представлены уровни доверительной вероятности для всех 40 089 из 749 157, отобранных после соответствующих процедур SNPs по aberrantным клеткам. На оси ор-

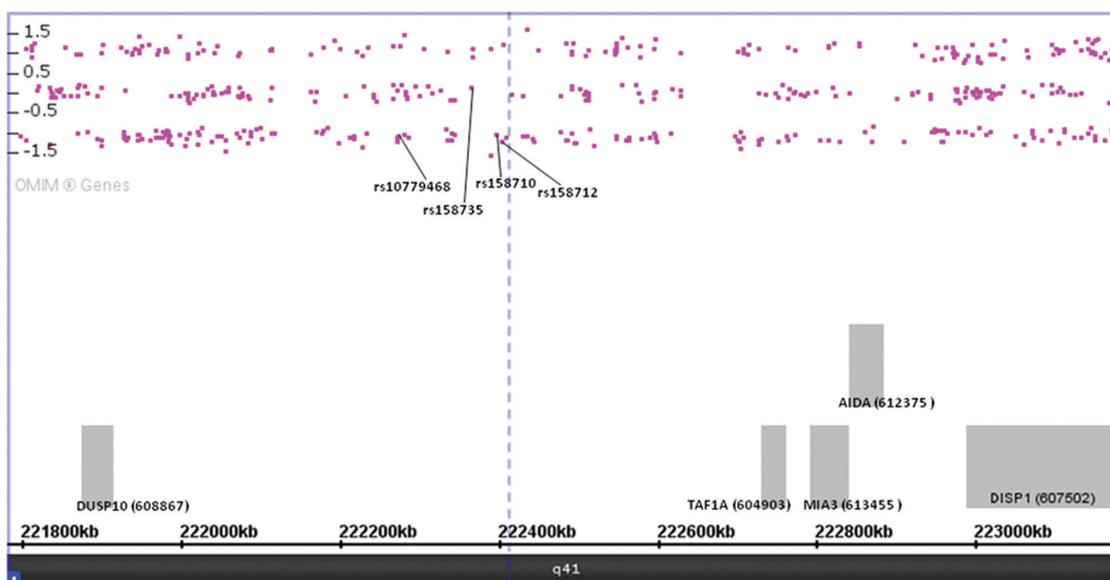


Рис. 2. Расположение SNPs rs10779468, rs158735, rs158710, rs158712 в межгенной области длинного плеча 1-й хромосомы

Таблица 1

**Показатели неравновесия по сцеплению (Dx-value и p-value)
для SNPs rs10779468, rs158735, rs158710 и rs158712**

SNPs	rs10779468		rs158735		rs158710		rs158712	
	Dx-value	p-value	Dx-value	p-value	Dx-value	p-value	Dx-value	p-value
rs10779468	–	–	0,8647	$3,116 \times 10^{-11}$	0,8686	$5,537 \times 10^{-12}$	0,9300	$5,076 \times 10^{-12}$
rs158735	0,8647	$3,116 \times 10^{-11}$	–	–	0,9418	$1,292 \times 10^{-15}$	1,0000	$8,381 \times 10^{-18}$
rs158710	0,8686	$5,537 \times 10^{-12}$	0,9418	$1,292 \times 10^{-15}$	–	–	1,0000	$1,688 \times 10^{-16}$
rs158712	0,9300	$5,076 \times 10^{-12}$	1,0000	$8,381 \times 10^{-18}$	1,0000	$1,688 \times 10^{-16}$	–	–

динат отложен отрицательный десятичный логарифм уровня доверительной вероятности. Линией сверху изображен уровень доверительной вероятности с учетом поправки Бонферрони, равный $-\log(0,05/40089) = -\log(1,247 \times 10^{-6}) = 5,9041$. Таким образом, на рис. 1 показано, что уровень поправки Бонферрони проходят 8 SNPs, которые у работников СХК, подвергавшихся радиационному воздействию, статистически значимо ассоциированы с повышенной частотой aberrантных клеток (рис. 1).

Четыре SNPs находятся в длинном плече 1-й хромосомы между генами *DUSP10* (Dual-Specificity Phosphatase 10 OMIM*608867) и *TAF1A* (TATA Box-Binding Protein-Associated Factor 1A OMIM* 604903) (рис. 2). Ген *DUSP10* относится к классу белков DUSP, которые дефосфорилируют по остаткам тирозина и серина белки митогенактивированных каскадов MAPK, ERK, JNK и p38; MAPK-каскады опосредуют различные процессы, включая клеточную пролиферацию, апоптоз, дифференцировку и стресс-реакции. Ген *TAF1A* кодирует белок, связанный с TATA-связывающим белком (TBP; 600075) (TAF), он необходим для РНК-полимеразы I синтезирующей рибосомную РНК. Полиморфизм rs10779468 по сборке GRCh37.p13 находится в позиции 1:222282882 (по сборке GRCh38.p7 в позиции 1:222109540). Далее только по сборке GRCh37.p13, которая используется в микроматрице CytoScan™ HD Array, rs158735 в позиции 1:222366608, rs158710 в позиции 1:222396017, rs158712 находится на 1-й хромосоме в позиции 1:222402787 (рис. 2).

Анализ неравновесия по сцеплению при помощи программы SNPalyze показал сцепление для всех 4 SNPs, они образуют гаплотип. Dx-value составил от 0,86 до 1 (табл. 1). Полное сцепление (Dx-value = 1) при данном размере выборки показали SNPs rs158710 и rs158712, что неслучайно – они находятся друг от друга всего лишь на расстоянии 6770 bp.

По-видимому, в длинном плече 1-й хромосомы между генами *DUSP10* и *TAF1A* в регионе 1:222282882–1:222402787 находится важная регуляторная область, которая может регулировать экспрессию генов, ответственных за чувствительность к действию ИИ. Возможно, здесь находится энхансер для некото-

рых downstream генов длинного плеча 1-й хромосомы, определяющих ИРЧ. Полный список 108 downstream генов с названиями, локализацией и менделевскими наследственными заболеваниями (OMIM Disorder), которые они вызывают, представлен в табл. 2. Возможным кандидатом на регуляцию из области 1:222282882–1:222402787 и непосредственно связанным с ИРЧ является ген *PARP1* (*173870) (табл. 2). Он находится на расстоянии 4145604 bp от обозначенного выше региона. *PARP1* вместе с генами *BRCA1* и *BRCA2* участвует в репарации двуниевых разрывов ДНК, которые образуются в том числе и под действием ИИ и являются основной причиной aberrаций хромосомного типа – основных маркеров радиационного воздействия [22].

Межгенный полиморфизм rs11131536 находится на 4-й хромосоме в позиции 4: 65306853 между генами *ADGRL3* (Adhesion G Protein-Coupled Receptor L3 OMIM* 616417) и *EPHA5* (Ephrin Receptor EphA5 OMIM* 600004) и относится к не охарактеризованным регионам, информация о его функциональном значении отсутствует. Ген *ADGRL3* участвует в клеточной адгезии и может играть роль в стабилизации синапсов. Ген *EPHA5* относится к рецепторным тирозинкиназам и участвует в трансдукции сигнала.

Остальные идентифицированные SNPs находятся в интронах. Вариация rs528170 принадлежит гену *PACRG* (Parkin coregulated gene), который располагается на длинном плече 6-й хромосомы в позиции 6q26 и кодирует одноименный белок [23]. *PACRG* взаимодействует с находящимся рядом геном *PRKN*, ассоциированным с юношеской аутосомно-рецессивной болезнью Паркинсона. Эти гены делят двунаправленный промотер и совместно регулируются убиквитин-протеасомной системой в различных тканях [24]. Также оба эти гена ассоциированы с восприимчивостью к проказе [25]. *PACRG* образует молекулярный комплекс с шаперонами и белками теплового шока 70 и 90. *PACRG* является компонентом телец Леви и подавляет прогрессирующую гибель нейронов [26]. Также показано, что мутации в промотерном регионе гена *PACRG* могут рассматриваться как фактор риска, ассоциированный с азооспермией и мужским бесплодием

Таблица 2

Список downstream после области 1:222282882–1:222402787 генов OMIM длинного плеча 1-й хромосомы

Название и номер OMIM					
<i>TAF1A</i> (604903)	<i>H3F3A</i> (601128)	<i>TRIM17</i> (606123)	<i>GNPAT</i> (602744)	<i>NID1</i> (131390)	<i>MAP1LC3C</i> (609605)
<i>MIA3</i> (613455)	<i>ACBD3</i> (606809)	<i>HIST3H3</i> (602820)	<i>EXOC8</i> (615283)	<i>GPR137B</i> (604658)	<i>CEP170</i> (613023)
<i>DISP1</i> (607502)	<i>MIXL1</i> (609852)	<i>HIST3H2A</i> (615015)	<i>SPRTN</i> (616086)	<i>ERO1B</i> (615437)	<i>SDCCAG8</i> (613524)
<i>TLR5</i> (603031)	<i>LIN9</i> (609375)	<i>HIST3H2BB</i> (615046)	<i>EGLN1</i> (606425)	<i>EDARADD</i> (606603)	<i>ZBTB18</i> (608433)
<i>SUSD4</i> (615827)	<i>PARP1</i> (173870)	<i>RNF187</i> (613754)	<i>TSNAX</i> (602964)	<i>LGALS8</i> (606099)	<i>ADSS</i> (103060)
<i>CAPN2</i> (114230)	<i>ITPKB</i> (147522)	<i>RHOA</i> (606366)	<i>DISC1</i> (605210)	<i>ACTN2</i> (102573)	<i>DESI2</i> (614638)
<i>TP53BP2</i> (602143)	<i>PSEN2</i> (600759)	<i>RAB4A</i> (179511)	<i>SIPA1L2</i> (611609)	<i>MTR</i> (156570)	<i>COX20</i> (614698)
<i>FBXO28</i> (609100)	<i>ADCK3</i> (606980)	<i>CCSAP</i> (616762)	<i>MLK4</i> (614793)	<i>RYR2</i> (180902)	<i>HNRNP1</i> (602869)
<i>DEGS1</i> (615843)	<i>CDC42BPA</i> (603412)	<i>ACTA1</i> (102610)	<i>KCNK1</i> (601745)	<i>ZP4</i> (613514)	<i>KIF26B</i> (614026)
<i>NVL</i> (602426)	<i>WNT9A</i> (602863)	<i>NUP133</i> (607613)	<i>COA6</i> (614772)	<i>CHRM3</i> (118494)	<i>SMYD3</i> (608783)
<i>DNAH14</i> (603341)	<i>WNT3A</i> (606359)	<i>ABCB10</i> (605454)	<i>TARBP1</i> (605052)	<i>FMN2</i> (606373)	<i>TFB2M</i> (607055)
<i>LBR</i> (600024)	<i>ARF1</i> (103180)	<i>GALNT2</i> (602274)	<i>IRF2BP2</i> (615332)	<i>GREM2</i> (608832)	<i>CNST</i> (613439)
<i>ENAH</i> (609061)	<i>MRPL55</i> (611859)	<i>PGBD5</i> (616791)	<i>TOMM20</i> (601848)	<i>RGS7</i> (602517)	<i>AHCTF1</i> (610853)
<i>SRP9</i> (600707)	<i>GUK1</i> (139270)	<i>COG2</i> (606974)	<i>ARID4B</i> (609696)	<i>FH</i> (136850)	<i>ZNF695</i> (616348)
<i>EPHX1</i> (132810)	<i>GJC2</i> (608803)	<i>AGT</i> (106150)	<i>GGPS1</i> (606982)	<i>KMO</i> (603538)	<i>ZNF124</i> (194631)
<i>LEFTY1</i> (603037)	<i>IBA57</i> (615316)	<i>CAPN9</i> (606401)	<i>TBCE</i> (604934)	<i>CHML</i> (118825)	<i>ZNF496</i> (613911)
<i>PYCR2</i> (616406)	<i>OBSCN</i> (608616)	<i>ARV1</i> (611647)	<i>GNG4</i> (604388)	<i>EXO1</i> (606063)	<i>NLRP3</i> (606416)
<i>LEFTY2</i> (601877)	<i>TRIM11</i> (607868)	<i>TRIM67</i> (610584)	<i>LYST</i> (606897)	<i>BECN2</i> (615687)	<i>OR13G1</i> (611677)

[27]. Какие-либо данные о влиянии полиморфного варианта rs528170 на функции гена *PACRG* отсутствуют.

Вариант rs9533572 также является интронным и принадлежит гену *ENOX1* (ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1). *ENOX1* локализован в длинном плече 13-й хромосомы (13q14.11), кодирует оксидоредуктазу, участвующую в транспорте электронов в плазматической мембране. Имеет сайт для связывания НАДФ и ионов меди [28]. Показано, что экспрессия *ENOX1* в лимфобластоидных клетках снижена на 20 %, и мутация в гене ассоциирована с наследственной аутоиммунной миастенией [29]. В мировой литературе на данный момент отсутствуют данные, указывающие на функциональное значение полиморфного варианта rs9533572 гена *ENOX1*.

Еще один интронный вариант rs10512439 принадлежит гену *MYO1D* (myosin ID), этот ген располагается в длинном плече 17-й хромосомы (17q11.2) и кодирует одноименный белок, участвующий в регуляции мембранного транспорта и мембранного натяжения. Последние исследования указывают на важную роль миозина 1D в развитии нервной системы, а также в процессе миелинизации [30]. Предположительно, мутации в гене ассоциированы с повышенным риском аутизма [31].

Как видно из табл. 3, у носителей минорных генотипов по всем восьми идентифицированным полиморфизмам частота aberrantных клеток в среднем в 1,5–1,8 раза выше, чем у носителей «дикого» и гетерозиготного генотипов.

Таблица 3

Частота aberrантных клеток у работников СХК в зависимости от генотипов (рецессивная модель) идентифицированных SNPs

SNPs	Генотип	N	M ± m	p-value с поправкой Бонферрони	Отношение средних по генотипам
rs10779468	T/T	7	4,70 ± 0,69	0,0051	1,67
	C/C+C/T	27	2,78 ± 0,22		
rs158735	G/G	8	4,71 ± 0,60	0,0130	1,73
	T/T+T/G	29	2,73 ± 0,28		
rs158710	G/G	8	4,71 ± 0,60	0,0241	1,67
	A/A+A/G	26	2,79 ± 0,23		
rs158712	C/C	8	4,71 ± 0,60	0,0130	1,73
	T/T+T/C	29	2,73 ± 0,21		
rs11131536	C/C	8	4,39 ± 0,64	0,0337	1,60
	A/A+A/C	28	2,74 ± 0,22		
PACRG rs528170	C/C	6	4,52 ± 0,85	0,0496	1,54
	T/T+T/C	30	2,93 ± 0,22		
ENOX1 rs9533572	G/G	8	4,41 ± 0,62	0,0287	1,57
	T/T+C/T	29	2,81 ± 0,23		
MYO1D rs10512439	G/G	7	4,92 ± 0,61	0,0381	1,82
	A/A+A/G	29	2,70 ± 0,21		

Примечание: N – количество человек с данным генотипом в исследуемой группе; M – средняя арифметическая; m – стандартная ошибка средней; p-value – уровень статистической значимости с поправкой Бонферрони

Обнаруженные полиморфные варианты, минорные генотипы которых ассоциированы с повышенной частотой aberrантных клеток у работников СХК, подвергавшихся радиационному воздействию в дозах 100–300 мЗв, можно рассматривать в качестве потенциальных маркеров ИРЧ.

Для подтверждения выявленных ассоциаций необходимы дальнейшие валидационные исследования на расширенной выборке лиц, подвергавшихся радиационному воздействию.

Заключение

Таким образом, при помощи полногеномных исследований с использованием микроматриц CytoScan™ HD Array (Affymetrix, США), содержащих 750 тыс. SNPs всех генов OMIM у 37 работников СХК, подвергавшихся длительному низкоинтенсивному радиационному воздействию в диапазоне доз 100–300 мЗв, было выявлено 8 SNPs (rs10779468, rs158735, rs158710, rs158712, rs11131536, rs528170, rs9533572, rs10512439), ассоциированных с повышенной частотой aberrантных клеток в лимфоцитах периферической

крови. Четыре межгенных SNPs (rs10779468, rs158735, rs158710, rs158712) в длинном плече 1-й хромосомы, по-видимому, находятся в важном регуляторном регионе (1:222282882–1:222402787), который может выступать в качестве энхансера для downstream генов, определяющих ИРЧ, таких как *PARP1*. Интронные полиморфизмы (rs528170, rs9533572, rs10512439) принадлежат генам *PACRG*, *ENOX1*, *MYO1D*, и на эти гены следует обратить пристальное внимание, как на новых участников генетической детерминации ИРЧ.

Работа выполнена при поддержке ФМБА России (государственный контракт № 56.001.18.0 от 21.05.2018).

Для цитирования: Халюзова М.В., Цыганов М.М., Исубакова Д.С., Брониковская Е.В., Усова Т.В., Литвяков Н.В., Карпов А.Б., Тахауова Л.Р., Тахауов Р.М. Полногеномное ассоциативное исследование связи полиморфных локусов с повышенной частотой хромосомных aberrаций у лиц, подвергавшихся длительному радиационному воздействию // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 32–40.

DOI: 10.12737/article_5d1103efefe893.65968050

Genome Wide Association Study of an Association between Gene Polymorphisms and the Increased Frequency of Cytogenetic Abnormalities in the Persons Exposed to Long-Term Irradiation

M.V. Khalyuzova¹, M.M. Tsyganov², D.S. Isubakova^{1,2}, E.V. Bronikovskaya¹, T.V. Usova¹, N.V. Litviakov^{1,2,4}, A.B. Karpov^{1,3}, L.R. Takhauova³, R.M. Takhauov^{1,3}

1. Seversk Biophysical Research Center, Seversk, Russia;
2. Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, Russia;
3. Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;
4. National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia. E-mail: mail@sbrc.seversk.ru

M.V. Khalyuzova – Researcher; M.M. Tsyganov – Research Worker, PhD Biol.; D.S. Isubakova – Junior Researcher; E.V. Bronikovskaya – Junior Researcher; T.V. Usova – Junior Researcher; N.V. Litviakov – Head of Lab., Dr. Sci. Biol.; A.B. Karpov – Head of Dep., Dr. Sci. Med., Prof.; L.R. Takhauova – Student; R.M. Takhauov – Director, Dr. Sci. Med., Prof.

Abstract

Purpose: To conduct genome wide association study of the association of 750,000 SNPs and an increased frequency of different types of chromosomal aberrations, induced by chronic irradiation in the dose range of 100–300 mSv.

Material and methods: The study was conducted among Siberian Group of Chemical Enterprises healthy employees ($n = 37$) exposed to professional external γ -radiation in a dose range of 100–300 mSv. The *de novo* induced CNVs were previously detected in these persons. Mean dose – 188.8 \pm 8.3 mSv, median – 185 mSv, interquartile range – 147.8–218.7 mSv, min – 103.4 mSv, max – 295.8 mSv. Genotyping of DNA samples from 37 employees was carried out by microarray CytoScan™ HD Array (Affymetrix, USA), containing 750,000 SNP-markers of 36,000 genes. The standard cytogenetic analysis was performed in the entire examined group.

Results: We analyzed the association of these SNPs with the frequencies of aberrant cells and following chromosomal aberrations: single chromatid fragments, chromatid exchanges, paired fragments, dicentric, rings, and translocations. We have found that 8 SNPs (rs10779468, rs158735, rs158710, rs158712, rs11131536, rs528170, rs9533572, rs10512439) are associated with the frequency of aberrant cells.

Conclusion: We have discovered polymorphic variants that are associated with an increased frequency of aberrant cells in workers of Siberian Group of Chemical Enterprises exposed to irradiation at a dose of 100–300 mSv. This polymorphic variants can be considered as potential markers of individual radiosensitivity. To confirm identified associations, further validation studies on an extended sample of people exposed to radiation are needed.

Key words: individual radiosensitivity, external γ -radiation, long-term radiation exposure, chromosomal aberrations, single nucleotide polymorphism

Article received: 10.10.2018. Accepted for publication: 21.05.2019

REFERENCES

1. Bush WS, Moore JH. Genome-wide association studies. PLoS Computational Biology. 2012;8(12):e1002822. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002822.
2. Freidin MB, Vasilyeva YeO, Skobelskaya YeV, Goncharova IA, Karpov AB, Takhauov RM. The prevalence and spectrum of chromosomal aberrations in workers of the Siberian Group of Chemical Enterprises. Bulletin of Siberian Medicine. 2005;(2):75-81. (Russian).
3. Sa'nikova LE, Chumachenko AG, Vesnina IN, Lapteva NSh, Kuznetsova GI, Abilev SK, Rubanovich AV. Polymorphism of Repair Genes and Cytogenetic Radiation Effects. Radiat Biol Radioecol. 2010;50(6):29-38. (Russian).
4. Abilev SK, Sa'nikova LE, Rubanovich AV. Candidate gene association study of the radiosensitivity of human chromosomes with candidate gene polymorphisms upon exposure to gamma-irradiation *in vitro* and *in vivo*. Gig Sanit. 2011;(5):14-8. (Russian).
5. Sa'nikova L, Chumachenko A, Belopolskaya O, Rubanovich A. Correlations between DNA polymorphism and frequencies of gamma-radiation induced and spontaneous cytogenetic damage. Health Phys. 2012;103(1):37-41. DOI: 10.1097/HP.0b013e3182231a9d.
6. Minina VI. Genetic Polymorphism and Chromosome Aberrations Induced by Radiation. Siberian Medical Journal. 2012;(3):5-7. (Russian).
7. Zhang X, Zhang X, Zhang L, Chen Q, Yang Z, Yu J, et al. XRCC1 Arg399Gln was associated with repair capacity for DNA damage induced by occupational chromium exposure. BMC Research Notes. 2012;5(1):263. DOI: 10.1186/1756-0500-5-263.
8. Hornhardt S, Rößler U, Sauter W, Rosenberger A, Illig T, Bickelböller H, et al. Genetic factors in individual radiation sensitivity. DNA Repair. 2014;16:54-65. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.02.001.
9. Rosenstein BS, West CM, Bentzen SM, Alsnér J, Andreassen CN, Azria D, et al. Zenhausern F. Radiogenomics: radiobiology enters the era of big data and team science. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2014;89(4):709-13. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.03.009.
10. Barnett GC, Coles CE, Elliott RM, Baynes C, Luccarini C, Conroy D, et al. Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study. Lancet Oncol. 2012;13(1):65-77. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70302-3.
11. Andreassen CN, Rosenstein BS, Kerns SL, Ostrer H, De Ruyscher D, Cesaretti JA, et al. Individual patient data meta-analysis shows a significant association between the ATM rs1801516 SNP and toxicity after radiotherapy in 5456 breast and prostate cancer patients. Radiother Oncol. 2016;121(3):431-9. DOI: 10.1016/j.radonc.2016.06.017.
12. Kerns SL, Ostrer H, Stock R, Li W, Moore J, Pearlman A, et al. Genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the development of erectile dysfunction in African-American men after radiotherapy for prostate cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010;78(5):1292-300. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.07.036.
13. Kerns SL, Stock R, Stone N, Buckstein M, Shao Y, Campbell C, et al. A 2-stage genome-wide association study to identify single

- nucleotide polymorphisms associated with development of erectile dysfunction following radiation therapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;85(1):e21-28. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2012.08.003.
14. Kerns SL, Stone NN, Stock RG, Rath L, Ostrer H, Rosenstein BS. A 2-stage genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms associated with development of urinary symptoms following radiotherapy for prostate cancer. *J Urol.* 2013;190(1):102-8. DOI: 10.1016/j.juro.2013.01.096.
15. Kerns SL, Stock RG, Stone NN, Blacksburn SR, Rath L, Vega A, et al. Genome-wide association study identifies a region on chromosome 11q14.3 associated with rectal bleeding following radiation therapy for prostate cancer. *Radiother Oncol.* 2013;107(1):372-76. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.05.001.
16. Fachal L, Gómez-Caamaño A, Barnett GC, Peleteiro P, Carballo AM, Calvo-Crespo P, et al. A three-stage genome-wide association study identifies a susceptibility locus for late radiotherapy toxicity at 2q24.1. *Nat Genet.* 2014;46(8):891-4. DOI: 10.1038/ng.3020.
17. Barnett GC, Thompson D, Fachal L, Kerns S, Talbot C, Elliott RM, et al. A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity. *Radiother Oncol.* 2014;111(2):178-85. DOI: 10.1016/j.radonc.2014.02.012.
18. Litviakov NV, Freidin MB, Khalyuzova MV, Sazonov AJ, Vasilyeva EO, Albakh EN, et al. The frequency and spectrum of cytogenetic anomalies in employees of Siberian Group of Chemical Enterprises. *Radiat Biol Radioecol.* 2014;54(3):283-96. DOI: 10.7868/S0869803114030084. (Russian).
19. Litviakov NV, Goncharik OO, Freidin MB, Sazonov AE, Vasilyeva EO, Mezheritskii SA, et al. The Estimate of Association Between Gene Polymorphisms and the Frequency and Spectrum of Cytogenetic Abnormalities in the Cohort of Siberian Group of Chemical Enterprises Employees Exposed to Professional Irradiation (Microarray Studies). *Radiat Biol Radioecol.* 2013;53(23):137-50. DOI: 10.7868/S0869803113020069. (Russian).
20. Khalyuzova MV, Litviakov NV, Isubakova DS, Bronikovskaya EV, Usova TV, Al'bach EN, et al. Validation of Association between Gene Polymorphisms and the Frequency of Cytogenetic Abnormalities in the Cohort of Employees of Radiation Facilities. *Radiat Biol Radioecol.* 2017;57(4):365-83. DOI: 10.7868/S0869803117040038. (Russian).
21. Takhauov RM, Karpov AB, Albach EN, Khalyuzova MV, Freidin MB, Litviakov NV, et al. The bank of biological samples representing individuals exposed to long-term ionizing radiation at various doses. *Biopreserv Biobank.* 2015;13(2):72-8. DOI: 10.1089/bio.2014.0035.
22. Powell SN, Kachnic LA. Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene.* 2003;22:5784-91.
23. West AB, Lockhart PJ, O'Farell C, Farrer MJ. Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter. *J Mol Biol.* 2003;326(1):11-9.
24. Taylor JM, Song YJ, Huang Y, Farrer MJ, Delatycki MB, Halliday GM, Lockhart PJ. Parkin Co-regulated Gene (PACRG) is regulated by the ubiquitin-proteasomal system and is present in the pathological features of parkinsonian diseases. *Neurobiol Dis.* 2007;27(2):238-47.
25. Schurr E, Alcaïs A, de Léséleuc L, Abel L. Genetic predisposition to leprosy: a major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Semin Immunol.* 2006;18(6):404-10.
26. Imai Y, Soda M, Murakami T, Shoji M, Abe K, Takahashi R. A product of the human gene adjacent to parkin is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death. *J Biol Chem.* 2003;278(51):51901-10.
27. Wilson GR, Sim ML, Brody KM, Taylor JM, McLachlan RI, O'Bryan MK, et al. Molecular analysis of the parkin co-regulated gene and association with male infertility. *Fertil Steril.* 2010;93(7):2262-8. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.01.079.
28. Entrez Gene: Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55068>.
29. Landouré G, Knight MA, Stanescu H, Taye AA, Shi Y, Diallo O, et al. NIH Intramural Sequencing Center. A candidate gene for autoimmune myasthenia gravis. *Neurology.* 2012;79(4):342-7.
30. Benesh AE, Fleming JT, Chiang C, Carter BD, Tyska MJ. Expression and localization of myosin-1d in the developing nervous system. *Brain Res.* 2012;1440:9-22. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.12.054.
31. Stone JL, Merriman B, Cantor RM, Geschwind DH, Nelson SF. High density SNP association study of a major autism linkage region on chromosome 17. *Hum Mol Genet.* 2007;16(6):704-15.
- For citation:** Khalyuzova MV, Tsyganov MM, Isubakova DS, Bronikovskaya EV, Usova TV, Litviakov NV, Karpov AB, Takhauova LR, Takhauov RM. Genome Wide Association Study of an Association between Gene Polymorphisms and the Increased Frequency of Cytogenetic Abnormalities in the Persons Exposed to Long-Term Irradiation. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2019;64(4):32-40. (Russian).
DOI: 10.12737/article_5d1103efefe893.65968050

**А.В. Бойко¹, Е.А. Дунаева¹, Л.В. Демидова¹, Б.Я. Алексеев², А.В. Леонтьев¹,
О.Б. Дубовецкая¹, Л.Г. Серова¹**

ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ, ОСЛОЖНЕННЫМ ГИДРОНЕФРОЗОМ

1. Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Минздрава РФ, Москва.
E-mail: onkoDEA@yandex.ru;

2. Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина Минздрава РФ, Москва

А.В. Бойко – зав. отделением, д.м.н., проф., член ESTRO; Е.А. Дунаева – с.н.с., к.м.н.;

Л.В. Демидова – в.н.с., д.м.н.; Б.Я. Алексеев – зам. генерального директора, д.м.н., проф., член EAU, член SIU;

А.В. Леонтьев – зав. отделением, к.м.н., член EANM; О.Б. Дубовецкая – н.с., к.м.н.; Л.Г. Серова – врач-онколог, к.м.н.

Реферат

Цель: Обоснование расширения показаний к лучевой или химиолучевой терапии за счет устранения обструкции мочеточников у больных первичным или рецидивным раком шейки матки, осложненным гидронефрозом.

Материал и методы: В исследование вошли 24 пациентки, которые получали лучевое или химиолучевое лечение с 2012 по 2018 гг. Из них у 17 больных был первичный РШМ и у 7 – рецидив РШМ в малом тазу. В соответствии с классификацией FIGO и TNM (2009 г.) у 16 больных установлена IIIВ стадия ($cT_{3b}N_{0-1}M_0$) и у 1 пациентки – IVВ стадия ($cT_{3b}N_1M_1$, метастазы в парааортальных лимфатических узлах). Средний возраст больных составил $48,8 \pm 9,9$ лет (от 32 до 73 лет). У всех пациенток до начала специального лечения выявлен одно- или двусторонний гидронефроз, обусловленный опухолевым процессом и сопровождавшийся нарушениями паренхиматозно-выделительной функции одной из почек различной степени.

Результаты: У 11 пациенток выполнено одностороннее, у 3 больных – двустороннее стентирование мочеточников, у 9 пациенток наложена нефростома и у 1 женщины – с одной стороны произведена установка мочеточникового стента, с другой стороны наложена нефростома.

У 70,8 % (17) больных курс облучения удалось выполнить без перерывов. У 5 пациенток перерыв в лечении составил от 10 дней до 3 нед (в связи с циститом, эндометритом, анемией). У 2 больных не удалось завершить полный курс лучевой терапии из-за некупируемых явлений пиелонефрита, они были оперированы. В сроки наблюдения до 77 мес (среднее время наблюдения 29 мес) 16 пациенток живы, из них 12 – без признаков рецидива болезни. У 6 пациенток восстановлен естественный пассаж мочи. У 4 больных нефростома заменена на мочеточниковый стент. У 3 пациенток с мочеточниковыми стентами производится их смена. Трое больных остаются с нефростомой. 8 женщин погибли от прогрессирования основного заболевания, из них 6 больных с рецидивом рака шейки матки в малом тазу. Отметим, что у всех 6 пациенток в результате проведенного облучения был достигнут выраженный паллиативный эффект в виде купирования болевого синдрома и кровотечения.

Заключение: Выполнение адекватного дренирования мочеточника/ов позволяет расширить показания к проведению лучевой или химиолучевой терапии по радикальной программе у больных первичным или рецидивным РШМ.

Ключевые слова: лучевая терапия, рак шейки матки, местнораспространенный и рецидивный, гидронефроз, деривация мочи

Поступила: 11.03.2019. Принята к публикации: 21.05.2019

Введение

Лучевая или химиолучевая терапия является возможной опцией для больных раком шейки матки (РШМ), начиная со стадии IV2 и единственным методом лечения для пациенток с IIIВ стадией, у которых первичная опухоль классифицируется как T_{3b} [1, 2].

Все клинические случаи РШМ с наличием гидронефроза, обусловленного сдавлением мочеточника опухолью, относят к IIIВ стадии по классификации FIGO и категории T_{3b} по системе TNM [3].

Частота встречаемости гидронефроза, а точнее, уретерогидронефроза среди больных местнораспространенным РШМ составляет от 14 до 44,2 % [4–7]. Высокая частота выявления уродинамических нарушений верхних мочевых путей у пациенток первичным РШМ делает актуальной проблему выбора плана лечения данной категории больных.

В настоящее время можно выделить следующие клинические подходы касательно ведения пациенток РШМ с наличием уретерогидронефроза.

Первый и основной лечебный подход – это проведение сочетанной лучевой терапии с одновременным еженедельным введением цисплатина 40 мг/м^2 без дополнительных мер по разгрузке почки, поскольку присутствие гидронефроза указывает лишь на распространенность РШМ в пределах IIIВ стадии [1, 2].

Другая лечебная тактика в отношении таких пациенток предполагает выполнение предварительной деривации мочи с целью создания условий для реализации агрессивного химиолучевого лечения по радикальной программе, т.к. рассматривает сдавление мочеточника или мочеточников как осложненное течение РШМ IIIВ стадии [5, 7, 8].

Третий, паллиативный, подход, при котором уретерогидронефроз расценивается исключительно

но в качестве осложненного течения РШМ и как основной симптом некурабельности больных. При подобном подходе в лучшем случае проводится паллиативная дистанционная лучевая терапия, в худшем – отказ в лучевом или химиолучевом лечении. Симптоматическому лечению подлежат также больные с гидронефрозом вследствие рецидива РШМ в малом тазу. Во многих случаях такая позиция обоснованна и приводит к трагическому исходу у пациентов первичным РШМ, которых можно излечить, а также у больных рецидивным РШМ, у которых возможно добиться выраженного паллиативного эффекта, предпослав лучевому лечению дренирование мочеточника(ов) и, соответственно, устранив причину почечной недостаточности.

В связи с этим целью нашего исследования являлось обоснование расширения показаний к лучевой или химиолучевой терапии за счет устранения обструкции мочеточников у больных первичным или рецидивным РШМ, осложненным гидронефрозом.

Материал и методы

В отделении лучевой терапии МНИОИ им. П.А. Герцена за период с марта 2012 по август 2018 гг. проведен курс лучевой или химиолучевой терапии 116 пациенткам РШМ IIIВ стадии ($cT_{3b}N_{0-1}M_0$) и 7 больным с рецидивом РШМ в малом тазу. Из них у 24 пациенток, что составило 19,5 %, по данным ультрасонографии выявлен одно- или двусторонний гидронефроз, обусловленный опухолевым процессом. У 23 пациенток гидронефроз установлен до начала специального лечения и у 1 пациентки гидронефротическая трансформация правой почки возникла в процессе проведения лучевого лечения.

Всем больным до начала облучения проведено комплексное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование, которое включало оценку распространенности опухолевого процесса и общего состояния.

Из 24 пациенток у 17 больных был первичный РШМ и у 7 – рецидив РШМ в малом тазу. В соответствии с классификацией FIGO и TNM (2009 г.) у 16 больных установлена IIIВ стадия ($cT_{3b}N_{0-1}M_0$) и у 1 пациентки – IVВ стадия ($cT_{3b}N_1M_1$, метастазы в парааортальных лимфатических узлах).

Средний возраст больных составил $48,8 \pm 9,9$ лет (от 32 до 73 лет).

Гистологическая структура опухолей была представлена в основном плоскоклеточным раком – 22 пациентки (91,6 %), различной степени дифференцировки: низкой – 13 (59,1 %) и умеренной – 9 (40,9 %). Аденокарцинома и железисто-плоскоклеточный рак встретились лишь в одном случае каждый (4,2 %).

Оценка функционального статуса больных РШМ проводилась по шкале ECOG-ВОЗ.

Для оценки нарушения паренхиматозно-выделительной функции почек использовался такой высокоинформативный метод радионуклидной диагностики, как динамическая нефросцинтиграфия, который был использован для 20 больных. У 1 пациентки выявлена I степень (единственной почки), у 5 – II степень и у 14 больных III степень нарушения паренхиматозно-выделительной функции одной из почек. У 3 пациенток с двусторонним гидронефрозом нарушения паренхиматозно-выделительной функции одной из почек были расценены как средняя степень, другой почки – как тяжелая.

Лабораторным показателем, отражавшим почечную недостаточность, являлся креатинин в биохимическом анализе крови. У большинства женщин (17/70,8 %) он был выше нормы (>98 мкмоль/л), но не превышал 110 мкмоль/л, у 2 (8,3 %) больных креатинин составлял 150 мкмоль/л и только у 5 (20,8 %) больных азотистые шлаки крови были в норме.

Всем пациенткам выполнено дренирование верхних мочевых путей. Отведение мочи осуществлялось 2 способами: стентированием мочеточника и/или выполнением чрезкожной пункционной нефростомии. Показаниями к стентированию мочеточника являлись нарушение выделительной функции почки с сохраненной паренхиматозной и нарушением паренхиматозной функции почки I–II степени. Условием для выполнения стентирования являлась возможность установки мочеточникового стента на длительный срок. В случае невозможности установки мочеточникового стента или при быстро нарастающих явлениях обструкции верхних мочевых путей, а также при тяжелой степени нарушения паренхиматозной функции почки выполнялась чрезкожная пункционная нефростомия [9].

У 7 (29,2 %) больных проведена лучевая терапия и у 17 (70,8 %) пациенток – химиолучевая терапия. При химиолучевом лечении применяли препараты платины и 5-фторурацила.

Облучение проводилось на линейном ускорителе электронов ONCOR Impression plus (Siemens), оснащенном многолепестковым коллиматором, тормозным излучением с номинальной энергией 18 МэВ. Определение и оконтуривание клинического и планируемого объемов облучения (CTV, PTV) осуществлялись в соответствии с рекомендациями МКРЕ № 50 (International Commission on Radiation Units and Measurements: Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy: ICRU Report 50. Bethesda, MD, 1993). Назначение дозы для 3D-конформной лучевой терапии (3D-CRT) производилось на изодозу 90 %, с

учетом покрытия 90 %, но не превышая 7 % «горящей» зоны.

Вторым компонентом сочетанной лучевой терапии являлась внутрисполостная гамма-терапия, которую проводили на аппарате Multisource HDR, работающем с источником ^{60}Co . Разовая очаговая доза составляла 5 Гр в точке А (дозиметрическое планирование осуществлялось по 2D изображениям).

Таким образом, полученные суммарные очаговые дозы (СОД) от сочетанной лучевой терапии составили: в точках А – от 79,5 до 93 Гр и точках В – от 52 до 66 Гр.

СОД у пациенток с рецидивом РШМ в малом тазу, получавших ранее радикальную лучевую терапию, составили 30–40 Гр, у пациенток после только хирургического лечения – 58–60 Гр.

Облучение проводилось на фоне терапии сопровождения, которая включала прием антибиотиков, назначаемых по результатам бактериального посева мочи, уросептиков, со сменой их каждые 10–14 дней, леспеприла и спазмолитиков. У больных с нефростомой осуществлялся тщательный уход за нефростомой.

Результаты и обсуждение

В основе стадирования любого злокачественного процесса лежат клинические критерии, характеризующие опухоль и оказывающие наибольшее влияние на прогноз жизни больных.

Одним из таких прогностических факторов у больных РШМ стал гидронефроз, вернее уретерогидронефроз, обусловленный сдавлением мочеточника/ов опухолью. Случаи РШМ с уретерогидронефрозом согласно классификациям FIGO и TNM, отнесены к IIIВ стадии и категории T_{3b} соответственно [3].

Предпосылкой для принятия данного решения Комитетом по TNM-классификации и Международной федерацией акушеров и гинекологов послужило знание об особенностях клинического течения РШМ. Так, для РШМ характерен прямой рост опухоли с прорастанием связочного аппарата матки и клетчаточных пространств таза (с возможным сдавлением мочеточника или мочеточников) и при этом опухолевый процесс в большинстве случаев на протяжении длительного времени остается местным или местно-регионарным.

В примечании к классификации TNM 7-го переиздания (2009) обращено внимание на то, что наличие гидронефроза или нефункционирующей почки вследствие стеноза мочеточника опухолью относит такой случай к III стадии [10]. В связи с этим все клинические случаи РШМ, осложненные уретерогидронефрозом, которые обусловлены опухолевым ростом, некорректно рассматривать в рамках I или II стадии.

В нашем исследовании у 16 из 116 пациенток РШМ IIIВ стадии (сT_{3b}N₀₋₁M₀) до начала специального лечения выявлен одно- или двусторонний гидронефроз, связанный с опухолью, что составило 13,8 %. Аналогичные показатели мы встретили в литературе. Тем не менее, в отдельных публикациях указана частота возникновения ретенционных осложнений верхних мочевых путей у больных РШМ при I и/или II стадии, что в соответствии с системой стадирования FIGO и TNM, повторимся, некорректно. В то же время, анализ частоты встречаемости обструктивной уропатии при IV стадии РШМ вполне допустим, поскольку присутствие уретерогидронефроза чаще всего свидетельствует о запущенном опухолевом процессе [4–7].

Следует отметить, что научных исследований, посвященных лечению больных первичным РШМ с уретерогидронефрозом, относительно невелико, и отношение к данному контингенту неоднозначное.

Тем не менее, согласно существующим стандартам, больные с местнораспространенными формами РШМ, в том числе с гидронефрозом, подлежат лучевому или химиолучевому лечению [1, 2]. Отведение мочи применяется только в случае повышения азотистых шлаков в крови.

В то же время, проведенный анализ работ зарубежных авторов показал, что за последнее десятилетие диаметрально изменилось отношение к больным РШМ, у которых гидронефроз, обусловленный ростом и локализацией опухолевого процесса, выявлен на этапе диагностики. Если раньше указанному контингенту дренирование почки или почек проводилось исключительно с паллиативной целью, то в последние годы деривация мочи стала осуществляться как малоинвазивное хирургическое пособие, позволяющее у большинства больных РШМ с гидронефрозом провести курс лучевой терапии, а отдельным пациенткам – химиолучевое лечение по радикальной программе [5, 7, 8].

В нашей стране за последнюю декаду также произошли существенные изменения, касающиеся больных РШМ, осложненным гидронефрозом. При нарушении пассажа мочи вследствие распространенного опухолевого процесса предварительное дренирование верхних мочевых путей или отведение мочи стало выполняться до начала специального лечения. Рентгеноэндоскопические вмешательства создали условия для реализации радикального и условно-радикального противоопухолевого лечения у 88 % пациенток, которые при поступлении в стационар были оценены как инкурабельные. Из них комбинированное лечение выполнено у 40 %, комплексное с неоадьювантной ПХТ препаратами платины, таксанами, гемцитабином, иринотеканом – у 25 %, химиолучевое с цитостатиками тех же групп – у 26,7 %, сочетанное лу-

чевое с локальной полирадиомодификацией – у 8,3 % [11]. К сожалению, подобные интервенционные технологии используются далеко не во всех онкологических учреждениях.

Более того, наш опыт показывает, что в ряде онкологических клиник на этапе определения показаний к лучевой терапии самой распространенной ошибкой остается необоснованный отказ от облучения из-за урологической патологии. Одной из наиболее частых причин отказа в лечении является нарушение паренхиматозно-выделительной функции почек из-за сдавления опухолевым инфильтратом одного или обоих мочеточников, приводящих к расширению чашечно-лоханочной системы. Связано это, в определенной степени, со стереотипом, который сложился у онкогинекологов. Еще профессор Я.В. Бохман в книге «Метастазы рака матки» (1976 г.) писал: «Исключительно неблагоприятное влияние на дальнейшее клиническое течение заболевания оказывает сдавление (инфильтратами) мочеточников, гидронефроз, нарушение функции почки (вплоть до «немой почки»), инфекция мочевых путей. Этот, так знакомый каждому онкологу симптомокомплекс, проявляется в терминальной фазе заболевания».

Однако в последние годы мы все чаще наблюдаем сохранных, в том числе, молодых пациенток, у которых выявляется РШМ, осложненный гидронефротической трансформацией. Нередки стали случаи, когда дебютом РШМ является уретерогидронефроз. Он протекает под маской острого пиелонефрита, мочекаменной болезни. Пациентки попадают в нефрологические, урологические стационары. Время уходит на длительное лечение урологической патологии. Лишь «случайный» осмотр гинеколога выявляет истинную причину гидронефроза. Направленная к онкогинекологу такая пациентка рассматривается как incurable, тогда как в основе оценки курабельности онкологического больного должен лежать комплексный подход, который включает в себя определение общего состояния больного и местного статуса (степени распространенности опухолевого процесса).

При оценке общего состояния учитываются: функциональный статус пациентки по шкале ECOG–ВОЗ; отсутствие дефицита массы тела больной (в клинической практике критериями значимой белково-энергетической недостаточности у онкологических пациентов можно считать потерю массы тела более чем на 10 %); уровень креатинина в биохимическом анализе крови не выше 150 мкмоль/л; уровень гемоглобина не ниже 100 г/л [12, 13].

Со стороны местного статуса должен отсутствовать симптомокомплекс: лимфостаз нижних конечностей, ишалгия, гидронефроз. Только при таком сочетании симптомов гидронефроз свидетельствует о

крайней степени запущенности опухолевого процесса и действительно расценивается как терминальная фаза заболевания. Наличие же прямого прорастания смежных с шейкой матки органов (слизистой мочевого пузыря и прямой кишки) в настоящее время не являются абсолютным противопоказанием для химиолучевого лечения [1].

В нашей работе по результатам комплексного обследования все пациентки признаны курабельными. По шкале ECOG–ВОЗ большинство (21/87,5 %) пациенток чувствовали себя здоровыми. Только у 3 (12,5 %) больных имелась 2 степень нарушения функционального статуса. Обусловлено это было основным злокачественным процессом, болевым синдромом и наличием почечной недостаточности I ст.

Курабельное состояние пациенток позволило нам высказаться в пользу лучевой терапии, т.к. лишь одно- или двусторонний уретерогидронефроз, на наш взгляд, препятствовал проведению лучевой или химиолучевой терапии.

Необходимо отметить, что отношение онкогинекологов к уретерогидронефрозу у больных РШМ, в основном, пассивное, поскольку его наличие свидетельствует лишь о III стадии опухолевого процесса. В то время как в урологической практике восстановление пассажа мочи по верхним мочевым путям (ВМП) является важной задачей, требующей экстренного решения. Одним из эффективных и безопасных методов отведения мочи для сохранения функции почки или почек является дренирование ВМП внутренними мочеточниковыми стентами. Клиническими работами отечественных и зарубежных исследователей было показано, что дренирование ВМП с помощью мочеточникового стента может быть методом выбора у больных, нуждающихся в длительном или пожизненном дренировании ВМП. Стентирование мочеточников у пациентов преклонного возраста и с онкологическими заболеваниями позволяет сохранить качество их жизни и социальную адаптацию. В случае невозможности установки мочеточникового стента проводится нефростомия [9, 14]. В связи с вышеуказанным, оправдано до начала специального противоопухолевого лечения дренирование почки или почек [5, 7, 8, 11].

В проводимом нами исследовании у 11 пациенток выполнено одностороннее, у 3 больных – двустороннее стентирование мочеточников, у 9 пациенток выполнена пункционная чрезкожная нефростомия и у 1 женщины – с одной стороны произведена установка мочеточникового стента, а с другой стороны наложена нефростома. Интервенционные вмешательства проведены без осложнений.

После адекватного устранения обструкции мочеточника/ов у 23 больных была разгружена почка (или почки) до начала облучения и у 1 пациентки в процес-

се курса лучевой терапии и, таким образом, у большинства больных созданы условия для реализации лучевой или химиолучевой терапии по радикальной программе, а у единственной пациентки – продолжение облучения без перерыва в лечении.

Программа радикальной лучевой терапии предполагает не только дифференцированное по дозам и объемам облучения, но еще и проведение курса лечения у больных РШМ общей продолжительностью не более 8 нед [1]. Считается, что продление времени лечения приводит к снижению локального контроля от 0,3 до 1,6 % в день (Bese NS, 2007).

Работа, проведенная американскими исследователями, показала, что предварительное отведение мочи (стентирование или наложение нефростомы) у больных РШМ с уретерогидронефрозом не вызывает значительного увеличения общего времени лечения. Средняя продолжительность курса облучения составила 61 день в группе пациенток без гидронефроза по сравнению с 66 днями в группе пациенток с гидронефрозом, у которых до начала лечения осуществлялась деривация мочи ($p = 0,18$) [7].

В нашем исследовании у 70,8 % (17) больных курс облучения удалось выполнить без перерывов, среднее время лечения составило 50 сут (диапазон: 37–64 сут) у пациенток первичным РШМ и 28 сут (диапазон: 11–47 сут) у больных рецидивным РШМ. У двух больных не удалось завершить полный курс лучевой терапии из-за некупируемых явлений пиелонефрита, они были оперированы. У 5 пациенток перерыв в лечении составил от 10 сут до 3 нед, в связи с циститом, эндометритом, анемией II степени, из них 4 пациентки были с первичным РШМ и 1 больная рецидивным РШМ.

Известно, что «золотым» стандартом лечения местнораспространенного РШМ является химиолучевая терапия на основе цисплатина. При этом цисплатин помимо нейро-, миело- и ототоксичности обладает еще и нефротоксичностью. Риск нефротоксичности цисплатина значительно возрастает в условиях снижения функции почек и/или обструктивной уропатии. Альтернативные схемы включают гемцитабин или карбоплатин, обладающие меньшим токсическим воздействием на почки, и поэтому они могут использоваться при химиолучевом лечении у пациенток с почечной недостаточностью. Об этом сообщают отдельные онкологические учреждения. Однако эффективность карбоплатина и гемцитабина по сравнению с цисплатином в качестве радиосенсибилизатора может быть определена только в рандомизированных клинических испытаниях.

По нашему мнению, при проведении химиолучевого лечения у больных с уретерогидронефрозом должны быть взвешены показания к использова-

нию радиомодификаторов, поскольку паренхиматозная функция может длительное время оставаться сниженной, несмотря на то, что отток из почки восстановлен путем стентирования и/или наложения нефростомы. Чем дольше было сдавление мочеточника, тем позже почка восстанавливается, а в 30 % случаев функция бывает утеряна.

В настоящее время продолжается поиск способов применения радиосенсибилизаторов с меньшей общей токсичностью, например, направленная доставка 5-фторурацила и метронидазола к опухоли в виде аппликаций геля, текстильных материалов, гидрогелевых дисков («Колетекс») [15].

В нашей работе при выборе метода лечения (лучевое или химиолучевое) учитывалось, в первую очередь, функциональное состояние почек больной. У 7 (29,2 %) больных проведена лучевая терапия и у 17 (70,8 %) пациенток – химиолучевая терапия. В качестве радиомодификаторов были использованы цисплатин, карбоплатин и 5-фторурацил.

Следует отметить, что из 17 больных, получивших химиолучевое лечение, цисплатин применили у 7 пациенток в суммарных дозах (СД) от 90 до 240 мг. У 2 пациенток использовали карбоплатин в СД 600 мг. У остальных 8 женщин 5-фторурацил вводили либо внутривенно (СД = 2000 мг), либо аппликационно в виде гидрогелевых дисков (СД = 1500–2250 мг) к опухлево измененной шейке матки [13, 15].

В сроки наблюдения от 0 до 77 мес (среднее время наблюдения 29 мес) 16 пациенток живы, из них 12 – без признаков рецидива болезни. У 6 пациенток восстановлен естественный пассаж мочи. У 4 больных нефростома заменена на мочеточниковый стент. У 3 пациенток с мочеточниковыми стентами производится их смена. Трое больных остаются с нефростомой.

Восемь женщин погибли от прогрессирования основного заболевания. Из них 6 больных исходно лечились у нас с рецидивом РШМ в малом тазу. Отметим, что у всех 6 пациенток в результате проведенного облучения был достигнут выраженный паллиативный эффект в виде купирования болевого синдрома и кровотечения.

Заключение

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что нельзя опрометчиво отказываться в специальном лечении больным РШМ с нарушением уродинамики.

В оценке курабельности больных с местнораспространенным и рецидивным РШМ, осложненным гидронефрозом, должен использоваться комплексный подход, который включает в себя определение общего

состояния больной и местного статуса (степени распространенности опухолевого процесса).

Выполнение адекватного дренирования мочеочника/ов позволяет расширить показания к проведению лучевой или химиолучевой терапии по радикальной программе без перерывов и удлинения общего времени лечения у больных первичным мест-

нораспространенным или рецидивным РШМ, осложненным гидронефрозом.

Для цитирования: Бойко А.В., Дунаева Е.А., Демидова Л.В., Алексеев Б.Я., Леонтьев А.В., Дубовецкая О.Б., Серова Л.Г. Лучевая терапия у больных раком шейки матки, осложненным гидронефрозом // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 41–47.

DOI: 10.12737/article_5d1108af5d48d3.68800561

DOI: 10.12737/article_5d1108af5d48d3.68800561

Radiotherapy for Patients with Hydronephrosis-Induced Cervical Cancer

**A.V. Boyko¹, E.A. Dunaeva¹, L.V. Demidova¹, B.Ya. Alekseev², A.V. Leont'ev¹,
O.B. Dubovetskaya¹, L.G. Serova¹**

1. P.A. Hersen Moscow Oncology Research Center, Moscow, Russia. E-mail: onkoDEA@yandex.ru;

2. N.A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology, Moscow, Russia

A.V. Boyko – Head of Dep., Prof., Dr. Sci. Med., ESTRO Member; E.A. Dunaeva – Senior Researcher, PhD Med.; L.V. Demidova – Leading Researcher, Dr. Sci. Med.; B.Ya. Alekseev – Deputy Director, Dr. Sci. Med., Prof., EAU Member, SIU Member; A.V. Leont'ev – Head of Dep., PhD Med., EANM Member; O.B. Dubovetskaya – Research Worker, PhD Med.; L.G. Serova – Oncologist, PhD Med.

Abstract

Purpose: To justify the expansion of indications for radiation or chemoradiation therapy in patients with primary or recurrent cervical cancer complicated by hydronephrosis by eliminating obstruction of the ureters.

Material and methods: The study included 24 patients who received radiation or chemoradiotherapy from 2012 to 2018. 17 patients among them had primary cervical cancer and the other 7 had a relapse of cervical cancer in small pelvis. In accordance with FIGO and TNM classification (2009), stage IIIB was diagnosed ($cT_{3b}N_{0-1}M_0$) in 16 patients and stage IVB ($cT_{3b}N_1M_1$, metastasis in para-aortic lymph nodes) in 1 patient. Prior to the start of special treatment, in all patients was detected one- or two-sided hydronephrosis associated with a neoplastic process and accompanied by varying degrees of impaired parenchymal-excretory function of one of the kidneys.

Results: 11 patients had unilateral stenting, 3 patients had bilateral ureteral stenting, nephrostomy was performed in 9 patients and 1 woman had an ureteral stent installed on one side, nephrostomy was performed on the other side. In 70.8 % (17) patients, the irradiation course was performed without interruption. From 5 to 3 weeks (due to cystitis, endometritis, anemia). In 2 patients, it was not possible to complete the full course of radiotherapy because of the intractable effects of pyelonephritis, they were operated on. In the observation period up to 77 months (average observation time 29 months) 16 patients are alive, 12 of them are without signs of disease recurrence. In 6 patients, the natural passage of urine was restored. In 4 patients, the nephrostomy was replaced with a ureteral stent. In 3 patients with ureteral stents they are replaced. Three patients remain with nephrostomy. Eight women died from the progression of the underlying disease, of these, 6 patients are with recurrent cervical cancer in the pelvis. Note that in all 6 patients, as a result of the irradiation, a pronounced palliative effect was achieved in the form of relief of pain and bleeding.

Conclusion: Performing adequate drainage of the ureter(s) allows to expand the indications for radiotherapy or chemoradiation therapy under the radical program in patients with primary or recurrent cervical cancer.

Key words: radiotherapy, cervical cancer, locally advanced and recurrent, hydronephrosis, urine diversion

Article received: 11.03.2019. Accepted for publication: 21.05.2019

REFERENCES

1. Clinical recommendations. Cervical cancer. The association of Russian oncologists. 2017. ID: KP537 [cited 2018 Dec 27] Available from: <http://cancerlink.ru/cancer/clinical-guidelines-oncology-2017/clinical-guidelines-aor-2017>. (Russian).
2. NCCN (National Comprehensive Cancer Network, OCT 2017) (version 1.2019) Available at nccn.org. [cited 2018 Nov 05]
3. TNM classification of malignant tumours. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. 7th ed. NY: Springer-Verlag, 2010. 256 p.
4. Kaprin AD, Titova VA, Kostin AA, Rerberg AG. Improving the Diagnosis and Treatment of Retention Disorders of the Upper Urinary Tract in Patients with Stages IIIB–III cancer of the Cervix Uteri. *Cancer Urology*. 2012;8(2):98-101. DOI: 10.17650/1726-9776-2012-8-2-98-101. (Russian).
5. Rose PG, Ali S, Whitney CW, Lanciano R, Stehman FB. Impact of hydronephrosis on outcome of stage IIIB cervical cancer patients with disease limited to the pelvis, treated with radiation and concurrent chemotherapy: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2010; 117(2):270-5. DOI: 10.1016/j.ygyno.2010.01.045.
6. Goklu MR, Seekin KD, Togrul C, Goklu Y, Tahaoglu AE, Oz M, et al. Effect of hydronephrosis on survival in advanced stage cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(10):4219-22. DOI:10.7314/APJCP.2015.16.10.4219
7. Beckta JM, Carter JS, Wan W, Chafe WE, Abayomi OK, Proper MA, et al. Urinary Diversion in the Management of Locally

- Advanced Cervical Cancer Facilitates the Use of Aggressive Therapy without Adversely Effecting Overall Treatment Time. *EC Gynaecology*. 2016;3(1): 225-31.
8. Mankad M, Mishra K, Desai A, Patel S. Role of percutaneous nephrostomy in advanced cervical carcinoma with obstructive uropathy: a case series. *Indian J Palliat Care*. 2009;15(1):37-40.
 9. Chepurov AK, Zenkov SS, Mamaev NE, Pronkin EA. Prolonged drainage by ureteral stents: current state of the issue and prospects. *Andrology and Genital Surgery*. 2009;(2):44-8. (Russian).
 10. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynec Obstet*. 2009;(105):103-4.
 11. Kaprin AD, Titova VA, Kreynina YuM, Kostin AA. Urological complications in oncologic practice: diagnosis, interventional and conservative correction. Moscow; 2011. 168 p. (Russian).
 12. Protein-energy deficiency in cancer. In: Baranovsky AYu, editor. *Dietetics: Manual 5th edition*. St. Petersburg: Piter; 2017. p. 868-74. (Russian).
 13. Kurpeshev OK, Mardynsky YuS. Basic principles and methods of radiomodification in radiotherapy. In: Kaprin AD, Mardynsky YuS, editors. *Therapeutic Radiology. National leadership*. Moscow: GEOTAR-Media; 2018. P. 89-128. (Russian).
 14. Brotherhood H, Lange D, Chew BH. Advances in ureteral stents. *Transl Androl Urol* 2014;3(3):314-9. DOI: 10.3978/j.issn.2223-4683.2014.06.06.
 15. Boyko AV, Korytova LI, Oltarzhevskaya ND, editors. *Targeted drug delivery in the treatment of cancer patients*. Moscow: Special Medical Book Publisher; 2013. 200 p. (Russian).
- For citation:** Boyko AV, Dunaeva EA, Demidova LV, Alekseev BYa, Leont'ev AV, Dubovetskaya OB, Serova LG. Radiotherapy for Patients with Hydronephrosis-Induced Cervical Cancer. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2019;64(4):41-7. (Russian). DOI: 10.12737/article_5d1108af5d48d3.68800561

**Б.Я. Наркевич^{1,2}, С.В. Ширяев², И.В. Лагутина^{1,2}, Ю.В. Буйденко², Т.К. Харатишвили²,
Н.С. Петроченко²**

РАДИОМЕТРИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ УТЕЧКИ ХИМИОПРЕПАРАТА ПРИ РЕГИОНАРНОЙ ПЕРФУЗИИ ХИРУРГИЧЕСКИ ИЗОЛИРОВАННОЙ КОНЕЧНОСТИ

1. Ассоциация медицинских физиков России, Москва. E-mail: narvik@yandex.ru;

2. Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва

Б.Я. Наркевич – президент АМФР, в.н.с., д.т.н., проф., действ. член Международной инженерной академии;

С.В. Ширяев – зав. лаб., д.м.н., проф., член Европейской ассоциации ядерной медицины и визуализации, член Американской коллегии ядерной медицины, член Общества ядерной медицины и визуализации (США);

И.В. Лагутина – медицинский физик; Ю.В. Буйденко – врач-перфузиолог, в.н.с., д.м.н.;

Т.К. Харатишвили – врач-хирург, в.н.с., д.м.н., проф.; Н.С. Петроченко – врач-хирург, к.м.н.

Реферат

Цель: Модернизация и оценка клинической эффективности технологии непрерывного радиометрического контроля, проводимого при высокодозной химиотерапии хирургически изолированной конечности с опухолевыми очагами.

Материал и методы: Предложена модернизированная технология радиометрического контроля регионарной перфузии конечности. Она основана на *in vivo* мечении эритроцитов элюатом ^{99m}Tc с последующим непрерывным мониторингом активности меченых эритроцитов как имитатора химиопрепарата над областью сердца. Ее отличительными особенностями является внутривенное введение пирфотеха сразу после дачи ингаляционного наркоза с целью обеспечения достаточного уровня хелатирования эритроцитов, а также использование активности ^{99m}Tc менее ее минимально допустимого уровня, что позволяет проводить работы с открытым источником ионизирующего излучения без нарушения требований нормативных документов по обеспечению радиационной безопасности.

Результаты: Разработанная технология была успешно использована при 106 регионарных перфузиях верхних и нижних конечностей у больных меланомой или саркомой мягких тканей. В 4 случаях по результатам радиометрического контроля понадобилось вмешательство хирургической бригады для уменьшения происходящей утечки химиопрепарата.

Заключение: Модернизированная нами технология непрерывного радиометрического мониторинга *in vivo* меченных ^{99m}Tc эритроцитов отличается простотой выполнения, клинической эффективностью за счет своевременного принятия мер по предотвращению или снижению утечки химиопрепарата из изолированной конечности, выполнением радиационно-гигиенических требований по работе с открытыми источниками ионизирующих излучений непосредственно в хирургической операционной, а также низкой лучевой нагрузкой на больного и персонал.

Ключевые слова: высокодозная химиотерапия, хирургически изолированная конечность, регионарная перфузия, утечка химиопрепарата, радиометрический контроль

Поступила: 22.01.2019. Принята к публикации: 21.05.2019

Введение

Среди пациентов, страдающих такими заболеваниями, как меланома кожи, рак кожи и саркомы мягких тканей, выделяют группу с местнораспространенными формами опухолевого процесса. Стандартные методы лечения пораженных конечностей, включающие хирургическое лечение, химио- и лучевую терапию, не всегда оказываются эффективными. Особенности течения болезни иногда не позволяют использовать сохранные оперативные вмешательства, а калечащие операции, например ампутация пораженной конечности, резко снижают качество жизни пациентов. В некоторых случаях тот или иной метод лечения из указанных выше не может быть использован вообще.

Транзиторные метастазы меланомы встречаются в 5–8 % случаев у пациентов с меланомой высокого риска. Лечить этих больных непросто из-за биологических характеристик меланомы, таких как размер и количество очагов поражения. Хирургическое иссечение возможно лишь при небольшом количестве таких опухолевых образований, но затруднительно как при

коротком промежутке времени между возникновением новых очагов, так и при массивном и крупном поражении, а также при проводимых дополнительных методах лечения. Локальные формы меланомы с трудом поддаются системной терапии.

Саркомы мягких тканей, при их высокой способности давать отдаленные метастазы, также могут вызывать проблемы, вызванные локальным ростом. Наличие крупных первичных или рецидивных опухолевых образований может потребовать использования агрессивной хирургической тактики, часто в сочетании с лучевой терапией, что может приводить к потере функциональности конечности. При невозможности выполнить сохранную операцию, ампутация выступает как единственный способ локального лечения. С учетом данных различных исследований о том, что калечащие вмешательства не улучшают общую выживаемость, повсеместно нарастает тенденция к выполнению органосохранных операций.

Использование предложенной еще более 60 лет назад методики изолированной регионарной химиотерапевтической перфузии конечности позволяет в этих

случаях локально воздействовать только на пораженную опухолью область. Изолированная регионарная перфузия – метод временной хирургической изоляции пораженной конечности с осуществлением искусственного кровообращения и проведением химиотерапии только в ее пределах, при этом сама конечность подвергается оксигенации и умеренной гипертермии. Основное достоинство регионарной перфузии состоит в том, что она позволяет использовать такую местную концентрацию химиопрепаратов в конечности с опухолью, которая в 15–25 раз превышает таковую при системном введении, без высокотоксических побочных эффектов для организма больного в целом.

В настоящее время описано более 40 вариантов и режимов проведения этой процедуры [1]. Изоляция пораженной конечности достигается посредством клипирования и последующей канюляции магистральных сосудов конечности (артерии и вены), создания изолированного контура кровообращения с проведением оксигенации в его пределах с помощью аппарата искусственного кровообращения (АИК), лигацией коллатеральных сосудов, через которые может осуществляться отток или приток крови сквозь границы контура, путем наложения жгута на заранее выбранном уровне конечности. Введение химиопрепаратов начинают только после стабильной изоляции системного кровотока от кровообращения в конечности. В ходе перфузии температура тканей конечности постоянно мониторируется. После 60–90 мин перфузии конечность отмывается растворами кристаллоидов, канюли удаляются, жгут снимают, и проходимость сосудов восстанавливается.

Вследствие чрезвычайно высокой токсичности высоких доз химиопрепаратов при их попадании в системную гемодинамику, обязательным условием проведения регионарной перфузии является контроль их возможной утечки из изолированной конечности. Предложено достаточно много технологий такого мониторинга, меньшинство из которых относятся к методикам прямого контроля. В частности, здесь можно отметить отбор проб венозной крови из системной циркуляции с последующим иммунохимическим анализом содержания в них химиопрепарата после перфузии [2], оценку гематокрита в венозной крови и в АИК до и после перфузии [3], определение уровня креатинфосфокиназы также до и после перфузии [4]. Однако все эти методики нельзя считать полноценным контролем утечки, поскольку результаты подобных измерений могут быть получены только по завершению перфузии без какой-либо возможности предотвращения неожиданно возникшей в ходе перфузии серьезной утечки и принятия своевременных мер по ее устранению. Несколько более продвинутым выглядит методика забора проб крови из АИК и из системной циркуляции на 5, 30 и 60-й минутах перфу-

зии с отсроченным их анализом методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [5], но и здесь по-прежнему отсутствует возможность ургентного исправления уже состоявшейся утечки.

От этого серьезного недостатка свободен метод радиометрического контроля утечки с использованием того или иного радиофармпрепарата (РФП). Принцип метода состоит в том, что в хирургически изолированную систему конечность + АИК вводится РФП в качестве меченого имитатора химиопрепарата. При наличии утечки из нее РФП попадает в системную гемодинамику, где скорость его поступления и уровень постепенного накопления могут быть зарегистрированы путем либо отбора и радиометрии проб венозной крови, либо неинвазивно с помощью детектора гамма-излучения, установленного над хорошо васкуляризованным участком тела больного, например, над сердцем. Предпочтительнее вторая из этих двух технологий, поскольку только она позволяет обеспечить непрерывный мониторинг содержания РФП в системной гемодинамике с возможностью срочного принятия тех или иных мер по полному блокированию или снижению темпов утечки химиопрепарата.

Хотя хирургические и химиотерапевтические аспекты регионарной перфузии к настоящему времени проработаны достаточно глубоко, до сих пор не существует унифицированной технологии контроля утечки, существуют различные подходы к организации и проведению измерений и даже к интерпретации результатов этих измерений.

В связи с этим целью данного исследования является проработка всех методических аспектов радиометрического контроля утечки химиопрепарата из хирургически изолированной конечности с возможностью их оптимизации на качественном уровне и с обеспечением радиационно-гигиенических требований по работе с открытыми источниками ионизирующих излучений (ИИИ) непосредственно в хирургической операционной.

Материал и методы

В качестве имитатора химиопрепарата были выбраны меченные *in vivo* ^{99m}Tc эритроциты, ранее успешно использованные нами для дифференциальной диагностики злокачественных опухолей и гемангиом печени [6]. Существование этой методики состоит во внутривенном введении хелатирующего агента пирфотеха (стандартная доза 50 мг), после чего через 20 мин пациенту также внутривенно вводится 300–500 МБк элюата ^{99m}Tc , и далее больному проводится динамическая и статическая сцинтиграфия печени. За эти 20 мин хелатирующий агент адсорбируется на оболочке эритроцитов, и введенный ^{99m}Tc присоединяется к хелату, т.е. получается меченое эритроцитом

in vivo. Такое мечение не препятствует газообмену в организме, который в дальнейшем протекает без возникновения как гипоксии, так и гиперкапнии.

Чтобы удовлетворить требованиям нормативного документа ОСПОРБ-99/2010 [7] по возможности работы с открытыми ИИИ в хирургической операционной без получения специального разрешения органов Госсанэпиднадзора РФ, мы были вынуждены вводить в систему изолированная конечность + АИК элюат ^{99m}Tc с активностью не 300–500 МБк, как в [6], а не более 100 МБк (разрешенное ОСПОРБ-99/2010 10-кратное значение так называемой минимально значимой активности – МЗА). Поэтому пришлось увеличивать продолжительность процесса хелатирования не менее чем до 1 ч, чтобы обеспечить большее содержание хелатированных эритроцитов в системной гемодинамике и в пока еще не изолированной конечности и, тем самым, более высокую вероятность прикрепления метки ^{99m}Tc к хелатированным эритроцитам. При реализации стандартной хирургической процедуры обеспечения доступа к магистральным артериям и вене конечности проходит именно столько времени, в связи с чем в/в введение пирфотеха теперь мы проводили сразу после дачи общего наркоза, а введение ^{99m}Tc в конечность – только через 1,0–1,2 ч, непосредственно после канюлизации ее сосудов и наложения изолирующего жгута.

С учетом всех этих обстоятельств была разработана следующая последовательность технологических процедур:

- Проводится радиометрия двух фасовок активностью 3–6 МБк и 80–100 МБк ^{99m}Tc на радиометре

РИС-1А (НПО «Амплитуда», Россия) в фасовочной лаборатории радиоизотопной диагностики, для которой имеется разрешение проведения работ с открытыми ИИИ по II классу. Регистрируются активности A_1 и A_2 соответственно.

- В хирургической операционной, куда доставляются обе фасовки в свинцовых контейнерах, выполняется повторная калибровка тех же двух фасовок без контейнеров в одинаковой геометрии измерений на специализированной радиометрической установке ISOMED 2166 (Med Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH, Германия). Регистрируются скорости счета импульсов N_1 и N_2 соответственно. Отношения A_1/A_2 и N_1/N_2 должны различаться не более чем на 5 %.
- Коллимированный сцинтилляционный детектор указанной радиометрической установки, упакованный в стерильный пленочный чехол, размещают над областью расположения сердца на расстоянии 2–3 см от поверхности тела больного. Штатив детектора должен не мешать работе анестезиолога, хирурга и перфузиолога, а также их ассистентов (рис. 1).
- Сразу после выполнения ингаляционного наркоза внутривенно вводится 50 мг пирфотеха в 5 мл физиологического раствора.
- После канюлизации сосудов конечности, присоединения к ним АИК и наложения жгута, в АИК вводится РФП активностью A_2 из второй фасовки.
- Через 3 мин (время полного размешивания РФП в гемодинамике изолированной конечности) детектором регистрируется скорость счета импульсов $N_{\text{подсв}}$, характеризующая «подсветку» установленного над сердцем детектора вследствие незначи-



Рис. 1. Общий вид расположения радиометрического детектора над областью сердца пациента

тельного проникновения гамма-квантов от РФП из изолированной конечности через боковую защиту детектора на его сцинтилляционный кристалл.

- В системную гемодиализацию внутривенно вводится РФП активностью A_1 из первой фасовки.
- Через 3 мин (время полного размешивания РФП в сосудах системной гемодиализации без изолированной конечности) детектором регистрируется скорость счета импульсов N_0 , характеризующая общую активность в системной гемодиализации и счет от «подсветки».
- Установка переключается в режим непрерывной регистрации скорости счета импульсов, и при отсутствии в течение последующих 3 мин изменений величины N_0 больше чем 0,5–1,0 % перфузиолог вводит в АИК терапевтическую дозу химиопрепарата, после чего в течение 1,0–1,5 ч проводится регионарная перфузия конечности.

Интерпретация результатов измерений производится по следующему алгоритму. Предположим, что произошла полная утечка РФП (т.е. 100 %) из конечности в системную циркуляцию. Тогда виртуальная скорость счета импульсов N_{100} будет:

$$N_{100} = k \frac{A_1 + A_2}{V_{ВТ} + V_{АИК}}, \quad (1)$$

где k – коэффициент пропорциональности, зависящий от геометрии радиометрии и чувствительности детектора, A_1 – активность РФП в системной циркуляции, введенная внутривенно, A_2 – активность РФП, введенная в АИК и циркулирующая в АИК, конечности и в связанных с ними трубках, $V_{ВТ}$ – объем циркулирующей крови во всем теле, $V_{АИК}$ – объем циркулирующей крови в системе только АИК+ трубки.

Тогда реальная скорость счета N_0 , зарегистрированная после наложения жгута непосредственно перед введением химиопрепарата в изолированную конечность, есть:

$$N_0 = k \frac{A_1}{V_{ВТ} - V_{КОН}} + N_{\text{подсв}}, \quad (2)$$

где $V_{КОН}$ – объем циркулирующей крови в изолированной конечности, $N_{\text{подсв}}$ – скорость счета импульсов вследствие «подсветки» детектора гамма-излучением, выходящим из изолированной конечности. Если выразить параметр k из формулы (2) и подставить в (1), то получим:

$$N_{100} = \frac{A_1 + A_2}{A_1} (N_0 - N_{\text{подсв}}) \frac{V_{ВТ} - V_{КОН}}{V_{ВТ} + V_{АИК}}. \quad (3)$$

В формуле (3) все величины известны, поскольку значения A_1 , A_2 , N_0 и $N_{\text{подсв}}$ непосредственно регистрируются, значения $V_{ВТ}$ и $V_{КОН}$ вычисляются автоматически в зависимости от вида изолируемой конечности (нога или рука), массы тела и пола пациента с использованием программного обеспечения радиометриче-

ской установки, а значение $V_{АИК}$ приведено в инструкции по эксплуатации АИК.

При наличии в момент времени t реальной утечки детектором регистрируется скорость счета $N(t)$, и тогда накопленная к моменту времени t относительная утечка РФП из конечности $L(t)$ может быть вычислена по формуле:

$$L(t) = \frac{N(t) - N_{\text{подсв}}}{N_{100}} \cdot 100 \%. \quad (4)$$

Надо отметить, что в стандартном программном обеспечении указанной радиометрической установки вместо формулы (1) используется менее точная формула:

$$N_{100} \approx k \frac{A_2}{V_{ВТ} + V_{АИК}}, \quad (5)$$

основанная на практически бесполезном допущении $A_1 \ll A_2$, из-за чего точная формула (3) становится приближительной:

$$N_{100} \approx \frac{A_2}{A_1} (N_0 - N_{\text{подсв}}) \frac{V_{ВТ} - V_{КОН}}{V_{ВТ} + V_{АИК}}. \quad (6)$$

Вследствие этого текущие абсолютные значения относительной утечки $L(t)$ оказываются завышенными на 5–7 %.

Расчитанные с использованием формулы (6) текущие значения накопленной утечки $L(t)$ и ее изменения во времени выводятся на экран компьютера радиометрической установки в виде табулированных цифровых показателей и графика.

Результаты и обсуждение

Разработанная технология радиометрического контроля утечки была успешно использована в 106 процедурах регионарной перфузии химиопрепаратов. В подавляющем большинстве случаев утечка отсутствовала, и результирующая кривая накопленной утечки представляла собой плато, зашумленное статистическими флуктуациями скорости счета (рис. 2). Однако в восьми случаях утечка имела место, но в пределах допустимого уровня общей накопленной утечки 10 % (рис. 3), и только в трех случаях потребовалось вмешательство анестезиолога (повышение давления в системной гемодиализации) и/или перфузиолога (понижение давления в системе АИК + конечность) (рис. 4), а еще в одном случае хирургу пришлось увеличивать натяжение жгута (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о реальной клинической эффективности непрерывного радиометрического контроля утечки и его преимуществах по сравнению с другими методами, реализуемыми без использования РФП, поскольку, прежде всего, все эти методы ограничены возможностью проведения лишь

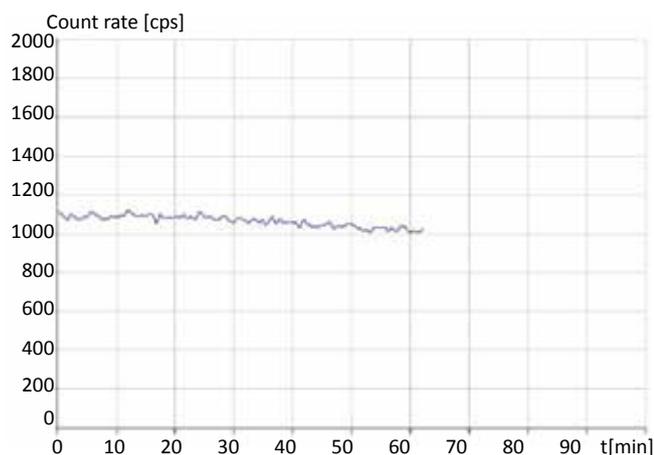


Рис. 2. Типичный вид контрольного графика при отсутствии утечки химиопрепарата из изолированной конечности

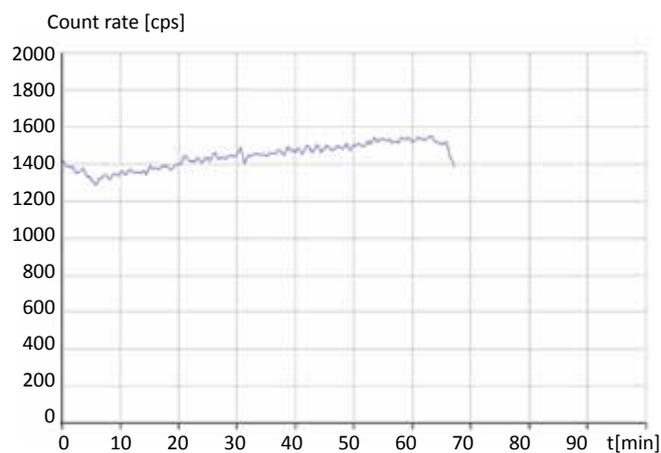


Рис. 3. Типичный вид контрольного графика при наличии допустимой утечки химиопрепарата из изолированной конечности

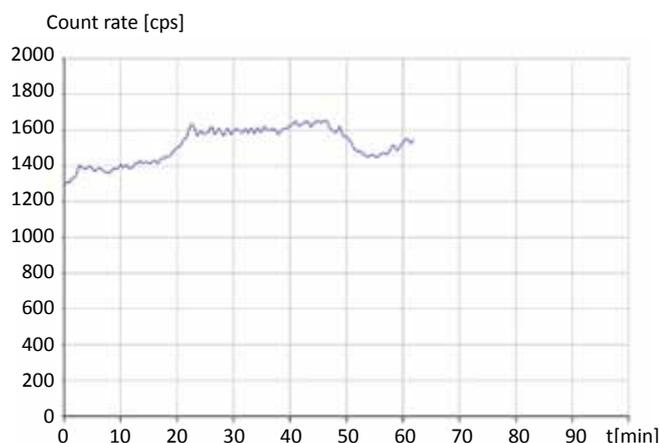


Рис. 4. Типичный вид контрольного графика при наличии недопустимой утечки, блокированной на 23-й минуте перфузии путем снижения давления в АИК и повышения давления крови в системной циркуляции

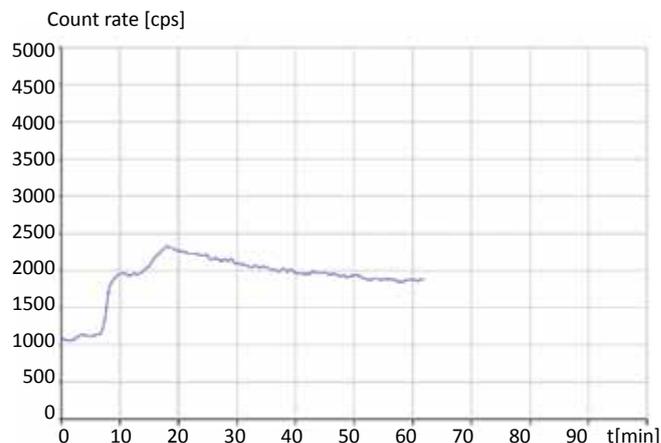


Рис. 5. Вид контрольного графика при наличии недопустимой утечки, частично сниженной на 10-й минуте перфузии путем снижения давления в АИК и полностью блокированной на 17-й минуте перфузии путем повышения натяжения жгута на конечности

однократного послеоперационного контроля уже произошедшей утечки.

Для методов радиометрического контроля утечки существует определенная свобода выбора РФП. Сравнительно нечасто с такой целью используют альбумин сыворотки крови человека, меченный ^{125}I или ^{131}I [8, 9]. Из-за низкой энергии характеристического и гамма-излучения ^{125}I (около 30 кэВ) приходится отказываться от непрерывного контроля утечки и использовать технологию многократного отбора проб венозной крови с их последующей радиометрией *in vitro*, поскольку стандартные коллимированные детекторы на основе сцинтиллятора NaI(Tl) не обладают необходимой чувствительностью для измерений *in vivo*. Что касается ^{131}I -альбумина, то вследствие высокой

энергии гамма-излучения ^{131}I (364 кэВ) и наличия бета-излучения использование этого РФП обуславливает более высокую лучевую нагрузку на персонал и на больного, из-за чего, например, авторы работы [3] отказались от использования РФП вообще и ограничились послеоперационным контролем по гематокриту. Кроме того, за 2 сут до операции больному приходится принимать препарат йодида калия для блокировки щитовидной железы, а лучевая нагрузка от бета- и гамма-излучения ^{131}I на больного и на персонал существенно выше по сравнению с уровнями облучения от $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Чаще всего используют $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -альбумин, для которого указанные недостатки отсутствуют [1, 8, 10], но поскольку в ходе перфузии имеет место определенный

выход альбумина, в том числе и меченного любым радионуклидом, из кровеносных сосудов во внесосудистое пространство, приходится вводить не совсем точную поправку к регистрируемым значениям накопленной утечки $L(t)$. Кроме того, в нашем случае мы не могли использовать наиболее распространенную в зарубежных клиниках технологию контроля с ^{99m}Tc -альбумином, поскольку отечественная промышленность перестала выпускать необходимые наборы для его синтеза.

Более продвинутой является технология использования в качестве РФП эритроцитов, меченных ^{99m}Tc . В ее первой разновидности прибегают к процедуре мечения *in vitro*, состоящей в том, что пробу крови больного инкубируют сначала с соединением, содержащим ионы Sn^{2+} , после чего – с элюатом ^{99m}Tc -пертехнетата, и после отмывки меченых эритроцитов физиологическим раствором приготовленный РФП вводят больному внутривенно [11]. Эффективность мечения эритроцитов здесь достигает 100 %, благодаря чему результаты применения такой технологии с отбором и радиометрией проб венозной крови считаются «золотым стандартом» для сравнения с другими технологиями радиометрического контроля [12–14]. Теоретически вся эта процедура занимает около 30 мин. Однако все работы с необходимой для мечения *in vitro* активностью ^{99m}Tc , в соответствии с требованиями ОСПОРБ-99/2010 [7], приходится проводить не в хирургической операционной, а в удаленной от нее лаборатории радиоизотопной диагностики, что существенно увеличивает продолжительность приготовления и использования РФП. Кроме того, в РФ также прекращен выпуск наборов для *in vitro* мечения эритроцитов.

Нами была использована вторая разновидность указанной технологии – мечение эритроцитов *in vivo*, описанная выше и несколько модифицированная нами по сравнению с общепринятыми [11, 15]. Ее основным достоинством является отсутствие всех перечисленных выше недостатков остальных технологий, реализуемых как без применения ИИИ вообще, так и с использованием РФП, а именно: 1) непрерывность контроля; 2) простота выполнения, особенно по сравнению с процедурой *in vitro* мечения эритроцитов; 3) оптимальная энергия регистрируемого *in vivo* гамма-излучения; 4) ненужность введения поправки на выход РФП из сосудистого русла; 5) обеспечение высокого уровня хелатирования эритроцитов; 6) возможность использования активности элюата ^{99m}Tc не более 10-кратной МЗА непосредственно в хирургической операционной.

Последнее обстоятельство обуславливает лучевые нагрузки как на больного, так и на персонал хирургической бригады на уровне примерно в 2 раза ниже естественного радиационного фона и в 10 раз ниже

предела дозы профессионального облучения персонала группы Б. В частности, эффективная доза внутреннего облучения пациента не превышала 400 мкЗв, а средняя эффективная доза внешнего гамма-облучения персонала (она имела место у перфузиолога) на одну процедуру регионарной перфузии не превышала 30 мкЗв, т.е. не более 1 мЗв в год при 30–35 операциях за год [16].

Для проведения радиометрического контроля утечки используют различные средства ядерной медицины, в том числе гамма-пробники (управляемые и устанавливаемые вручную автономные сцинтилляционные детекторы) [8, 14, 15], гамма-камеры с различными малоразмерными позиционно-чувствительными детекторами [8, 17] и специализированные радиометрические установки [10, 12, 13, 16, 18]. Гамма-пробники не снабжены ни достаточной радиационной защитой от бокового проникновения гамма-излучения на сцинтилляционный детектор, ни регулируемым штативом для продолжительной фиксации детектора относительно тела пациента в ходе достаточно продолжительной перфузии. Использование гамма-камеры, даже портативной, усложняет процедуру измерений и интерпретацию их результатов, поскольку информация о пространственном распределении РФП в васкуляризованном участке тела является избыточной для обеспечения непрерывного мониторинга только временного распределения РФП на этом участке. Специализированные радиометры свободны от этих недостатков, к тому же они, как правило, снабжены программным обеспечением для непрерывной регистрации накапливаемой относительной утечки. Более того, существуют многофункциональные варианты подобных установок, например, с одновременной регистрацией не только утечки, но и температуры, скорости кровотока и давления крови в изолированной конечности [18].

К сожалению, в рассмотренных здесь работах интерпретации результатов контроля утечки уделяется мало внимания, как правило, отсутствуют разъяснения – что именно авторы подразумевают под утечкой (leakage), многие формулы представлены в нечитаемом виде, иногда с ошибками вплоть до нарушения правила сохранения размерности входящих в них величин [8, 14, 15]. И в нашем случае, как было указано выше, в радиометрической установке почему-то для интерпретации была использована формула с точностью меньшей, чем это было бы возможно.

В работах чисто клинического плана методические аспекты обычно игнорируются, а алгоритмы интерпретации вообще не рассматриваются. Даже такой важный вопрос о том, какую утечку следует считать критической, обычно не обсуждается. По умолчанию большинство авторов полагают таким критическим уровнем 10 %, хотя другие считают, что для перфузии

мелфалана порог должен составлять 5 %, а для фактора некроза опухоли TNF- α – не более 1 % [8].

Выводы

1. Технологии радиометрического контроля утечки химиопрепарата при регионарной перфузии хирургически изолированной конечности принципиально превосходят все остальные технологии контроля, не связанные с использованием радиофармпрепаратов, за счет возможности выполнения непрерывного мониторинга утечки и, следовательно, своевременного принятия мер по ее прекращению или ослаблению.
2. Предложенная в данной работе технология радиометрического контроля с *in vivo* мечеными эритроцитами обеспечивает оперативность и необходимую точность контроля текущей и накапливаемой утечки, позволяя работать с минимально возможной активностью ^{99m}Tc непосредственно в хирургической операционной без нарушения установленных требований по обеспечению радиационной безопасности при работах с открытыми ИИИ.

3. Из 106 проведенных процедур регионарной перфузии в 4 случаях понадобилось вмешательство хирургической бригады для прекращения или ослабления утечки радиофармпрепарата, чем была подтверждена клиническая эффективность разработанной технологии радиометрического контроля утечки химиопрепарата из изолированной конечности в системную гемодинамику.
4. Лучевая нагрузка на больного за счет внутреннего облучения составляет всего 200–400 мкЗв благодаря отмывке всей введенной в конечность активности после окончания перфузии, а средняя годовая эффективная доза профессионального облучения персонала не превышает 1 мЗв, что в 2–2,5 раза ниже годовой дозы облучения от естественного радиационного фона.

Для цитирования: Наркевич Б.Я., Ширяев С.В., Лагутина И.В., Буйденко Ю.В., Харатишвили Т.К., Петроченко Н.С. Радиометрический контроль утечки химиопрепарата при регионарной перфузии хирургически изолированной конечности // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 48–55.

DOI: 10.12737/article_5d110f04375033.57581297

DOI: 10.12737/article_5d110f04375033.57581297

Leakage Radiometric Control of Chemical Drugs with Regional Perfusion of Surgical Isolated Limbs

B.Ya. Narkevich^{1,2}, S.V. Shiryaev², I.V. Lagutina^{1,2}, Yu.V. Buydenok², T.K. Kharatishvili², N.S. Petrochenko²

1. Association of Medical Physicists of Russia, Moscow, Russia. E-mail: narvik@yandex.ru;
2. N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

B.Ya. Narkevich – President of the AMPR, Leading Researcher, Dr. Sci. Tech., Prof., Academician of International Academy of Engineering; S.V. Shiryaev – Head of Lab., Dr. Sci. Med., Prof., Member of the European Association of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Member of the American College of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Member of the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging; I.V. Lagutina – Medical Physicist; Yu.V. Buydenok – Perfusionist, Leading Researcher, Dr. Sci. Med.; T.K. Kharatishvili – Surgeon, Leading Researcher, Dr. Sci. Med., Prof.; N.S. Petrochenko – Surgeon, PhD Med.

Abstract

Purpose: Modernization and evaluation of the clinical effectiveness of the technology of continuous radiometric monitoring carried out during high-dose chemotherapy of a surgically isolated limb with tumor foci.

Material and methods: A modernized radiometric control technology for regional limb perfusion is proposed. It is based on *in vivo* labeling of erythrocytes with ^{99m}Tc eluate followed by continuous monitoring of the activity of labeled erythrocytes as a simulator of a chemotherapy drug over the heart region. Its distinctive features are intravenous injection of a pyrfotech slice after giving inhalation anesthesia to ensure a sufficient level of red blood cell chelation, as well as using ^{99m}Tc activity less than its minimum significant level, which allows working with an open source of ionizing radiation without violating the requirements of radiation safety regulations.

Results: The developed technology was successfully used with 106 regional perfusion of the upper and lower extremities in patients with melanoma or sarcoma of soft tissues. In 4 cases, according to the results of radiometric control, the intervention of the surgical team was required to reduce the chemical preparation leakage that was occurring.

Conclusion: The technology upgraded by us is characterized by ease of implementation, the ability to take timely measures to prevent or reduce the leakage of a chemotherapy drug from an isolated limb according to the results of continuous *in vivo* radiometric monitoring of ^{99m}Tc -labeled red blood cells over the heart, as well as low radiation load on the patient and staff.

Key words: *high-dose chemotherapy, surgically isolated limb, regional perfusion, chemotherapy leaks, radiometric monitoring*

Article received: 22.01.2019. Accepted for publication: 21.05.2019

REFERENCES

1. Gargon GI, Pkhakadze NR, Senchik KYu, Gelfold VM. Perspective methods for treating patients with soft-tissue sarcomas of the extremities (isolated regional perfusion, local hyperthermia). *Practical Oncology*. 2004;5(4):276-84. (Russian).
2. Zwavelig JH, Maring JK, Mulder AB, et al. Effects of hyperthermic isolated limb perfusion with recombinant tumor necrosis factor α and melphalan on the human fibrinolytic system. *Cancer Res*. 1996;56: 3948-53.
3. Goldberg ME, Rosenblum HM, Seltzer JL, Rosato FE. Isolated regional perfusion: anesthetic technique, monitoring and blood replacement. *Canad J Anesthesia*. 1984. Sep;5:12-58. DOI: 10.1007/BF03009542
4. Kroon HM. Treatment of locally advanced limb infusions with cytotoxic drugs. *J Skin Cancer*. 2011; Article ID 106573. 7 pp.
5. Tatyanchikova NV. Evaluation of the effectiveness of the method of isolated regional perfusion in the combined treatment of patients with soft tissue sarcomas and skin melanoma of the extremities. Author. PhD Med. S.-Pb. 2012. 24 p. (Russian).
6. Shiryaev SV, Goncharov MO, Narkevich BYa. Development of radionuclide semiotics of liver hemangiomas using single-photon emission computed tomography with labeled red blood cells in the differential diagnosis of liver tumors. *Med Fizika*. 2009;3(43): 44-55 (Russian).
7. Basic Sanitary Rules for Radiation Safety OSPORB-99/2010. SP 2.6.1.2612-10. (as amended by change No. 1, approved by the resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation of September 16, 2013 No. 43). (Russian).
8. Vidal-Sicart S, Rull R, Barriuso C, Nieweg OE. Monitoring for systemic leakage during limb perfusion for melanoma. In: *Radioguided Surgery*. Ed. by Herrmann K, Nieweg OE, Povoski SP. Springer. 2016;359-69.
9. Vrouenraets BC, Eggermont AM, Hart AA, et al. Limb perfusion with melphalan and tumor necrosis factor-alpha versus toxicity after melphalan alone. *Regional Eur J Surg Oncol*. 2001;24(4):390-5. DOI: 10.1053/ejs.2001.1124
10. Di Filippo F, Rossi CR, Santinami M, Di Filippo S. Hyperthermic isolated limb perfusion with TNF α in the treatment of in-transit melanoma metastasis. *In vivo*. 2006;20:739-42.
11. National Radionuclide Diagnosis Manual. Lishmanov YuB, Chernov VI (Ed.) Vol. 2. Tomsk: STT. 2010;73-4. (Russian).
12. Wierth R, Lazarenko SV, de Jong JR, Willemsen AT. Characteristics of the leakage factor during regional hyperthermic isolated limb perfusion. *Nucl Med Commun*. 2011;32(9):858-62.
13. Paulsen IF, Chakera AH, Schmidt G, Drjøe J, Klyver H, Oturai PS, et al. Radionuclide leakage monitoring during hyperthermic isolated limb perfusion for local melanoma metastasis in an extremity. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2014;6(6). DOI: 10.1111/cpf.12164
14. Fiz F, Villa G, Ferrari E, Pomposelli E, Morbelli S, Alloisio A. Prevention of systemic toxicity in hyperthermic isolated lung perfusion using radioisotopic leakage monitoring. *Int J Hypertherm*. 2007;1-10. DOI: 10.1080/02656736.2017.1355485
15. Villa G, De Cian F, Pomposelli E, et al. Continuous leakage monitoring with Sn-medronat-^{99m}Tc-labeled RBC and hand-held gamma-probe during hyperthermic limb and lung perfusion. *Il Giornale di Chirurgia*. 2009;30(5 suppl.): 240-1.
16. Lipanova NN, Narkevich BYa. Evaluation of the patient and staff radiation dose at radiometric monitoring of open sources in diagnostics. *Med Fizika*. 2011;3(51):81-5. (Russian).
17. Orero A, Vidal-Sicart S, Roé N. Monitoring system for isolated limb perfusion based on a portable gamma camera. *Nuklearmedizin*. 2009;48(4): 166-72.
18. MedicalView >> Product. 3 sense. [https:// www.medicalview.ea/? page_id = 31](https://www.medicalview.ea/?page_id=31)

For citation: Narkevich BYa, Shiryaev SV, Lagutina IV, Buydenok YuV, Kharatishvili TK, Petrochenko NS. Leakage Radiometric Control of Chemical Drugs with Regional Perfusion of Surgical Isolated Limbs. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2019;64(4):48-55. (Russian).

DOI: 10.12737/article_5d110f04375033.57581297

E.S. Sukhikh^{1,2}, L.G. Sukhikh², E.L. Malikov², P.V. Izhevsky³, I.N. Sheino³, A.V. Vertinsky^{1,2}, A.A. Baulin^{2,4}

UNCERTAINTY OF MEASUREMENT ABSORBED DOSE BY GAFCHROMIC EBT3 DOSIMETER FOR CLINICAL ELECTRON AND PHOTON BEAMS OF MEDICAL ACCELERATORS

1. Tomsk Regional Oncology Centre, Tomsk, Russia. E-mail: e.s.sukhikh@gmail.com;
2. National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia;
3. A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia;
4. Gamma Clinic High-Precision Radiology Centre (Gamma Medtechnology Ltd), Obninsk, Russia

E.S. Sukhikh – Head of Dep., Assistant Prof., PhD Phys.-Math., Member of ESTRO, Member of EFOMP, Member of ISRS;
L.G. Sukhikh – Director of Research School of Physics, Dr. Sci. Phys-Math.; E.L. Malikov – Researcher;
P.V. Izhevsky – Leading Researcher, Assistant Prof., PhD Med.; I.N. Sheino – Head of the Lab., PhD Phys-Math.;
A.V. Vertinsky – Medical Physicist, PhD student; A.A. Baulin – Medical Physicist, PhD student, Member of ISRS

Abstract

Purpose: Investigation of the relative errors of absorbed dose measurement based on polymer films Gafchromic EBT3 for clinical electron and photon beams of medical accelerators.

Material and methods: Polymer Gafchromic EBT3 films were calibrated using different radiation beams, namely photon and electron beams of Elekta Axesse medical accelerator with beam energy equal to 10 MV and 10 MeV, correspondingly, and electron beam of a betatron for intraoperative radiotherapy with beam energy equal to 6 MeV. The film pieces were irradiated by the uniform dose field in the dose range from 0.5 to 40 Gy. The dose value was controlled by cylindrical ionization chamber on Elekta Axesse accelerator and by the Markus parallel-plate ionization chamber on betatron. The irradiated films were scanned using Epson Perfection V750 Pro flatbed scanner in 16 bit RGB color mode with 150 dpi resolution. The red and green channels were used for further analysis. The central part of each film was used for calculation of average values of net optical density and its root-mean-square. As a result, the calibration curves, i.e. dependence on the reference absorbed dose measured by ionization chamber on the net optical density were constructed taking into account uncertainties of dose measurement and optical density measurement.

Results: The relative uncertainty for the dose measurement lies within 7 % for low doses (less than 1 Gy) and within 4 % for higher doses. The green channel is less sensitive to the radiation, but its relative uncertainty values are in general 1–2 % lower than the ones for the red channel. The use of different calibration sources results in different calibration curves with difference up to ± 6 % for the green channel.

Conclusion: The polymer Gafchromic EBT3 films can be used for absorbed dose measurement for the doses not less than 0.5 Gy. For lower dose values the dose measurement uncertainty caused by statistical reasons amounts 15 %. For dose values of about 1 Gy and higher the dose measurement uncertainty amounts 5 % that allows to use the films for transverse and longitudinal prescription treatment dose distribution measurement with very high spatial resolution.

Key words: radiation therapy, Gafchromic EBT3 film, clinical dosimetry, medical accelerators, absorbed dose, uncertainties

Article received: 25.03.2019. Accepted for publication: 21.05.2019

Introduction

Radiation therapy is widely used for treatment of malignant tumors all over the world. The development of radiation therapy is based on the development of dose delivery techniques that include Intensity Modulated Radiation Therapy and Volumetric Modulated Arc Therapy. These techniques allow high-quality dose delivery that results in possibility to carry out hypofractionated radiation therapy. This fractionation type is effective for example in the cases of prostate carcinomas [1] or lung cancer [2]. IMRT and VMAT techniques are also effective in the case of irradiation of brain [3] or liver metastases [2]. Each dosimetric treatment plan which use high gradient dose fields should be verified before implementation and patient treatment. One of the widely used ways to check the treatment plan quality is based on the using of radiochromic polymer films that have the best spatial resolution among all dosimeters used in the medical physics. The typical spatial resolution of the polymer films is about 0.1 mm. That is why radiochromic dosimetric films are widely used in clinical dosimetry of photon, electron and proton beams mainly for obtaining of dose spatial distributions of a radiotherapy device.

Such films are not exposed by the visible light that makes them more reliable in routine operation. In 2011 third generation of radiochromic film Gafchromic EBT3 was presented. The film is a tissue-equivalent dosimeter with the dose measurement range 0.1–20 Gy according to the manufacture specification [4]. The film has low energy dependence and could be used for dosimetry of both electron and photon beams.

The main question that appears while operating any dosimetric system is its measurement uncertainty. According to the International Committee on Radiation Units the clinical dose delivered to the patient should lie in the range $D_{-7\%}^{+5\%}$ (D is the prescribed dose) resulting in the demand to clinical dosimetry be more accurate than ± 5 %. Measurement uncertainties of the main types of ionization chambers (“golden standard”) could be found in the international dosimetric protocols TRS-398 and TG-51 [5, 6]. For the ionization chambers the uncertainty values lie in the range 1.5–3.6 % depending on the radiation type and quality.

The possible sources of errors in the dose measurement using Gafchromic EBT3 film were analyzed by J. Sorriaux et al. [7]. In the cited reference the dose

measurement uncertainty was estimated to be equal to 0.55 % neglecting the local inhomogeneity of the film. Up to the best of our knowledge there were no investigations of the dose measurement uncertainties caused by local inhomogeneity (non-uniformity) of the dosimetric system based on the Gafchromic EBT3 film. Investigation of the previous generation of the film, Gafchromic EBT2, showed that the film local inhomogeneity was equal to 3.7 % while the uncertainty of the absorbed dose obtained using calibration curve counted more than 6 % [8]. According to the manufacture information the film uniformity is better than 3 % in the dose range 0.1–10 Gy [4]. It was also stated that for dose values more than 10 Gy the uncertainty may increase.

In the clinical practice the films are used for measurement of highly gradient transverse beam distributions [9]. In this case it is hard to estimate the value of dose measurement uncertainties caused by random reasons that include both film non-uniformity and statistical errors that appear in detector during film scanning. However, the value of the possible dose measurement uncertainties could be estimated during irradiation of the film by the flat field during film calibration routine. In this case one could rather simply calculate the statistical uncertainty of the dose measurement from calibration curve. In spite of the fact that Gafchromic EBT3 film non-uniformity and scanner statistical error could be calculated separately in our opinion in clinical practice understanding of the whole system is more reliable.

In this paper we present our investigation of the dose measurement uncertainties of dosimetric system that consisted of Gafchromic EBT3 film and Epson Perfection V750 scanner. In our investigation we used three different treatment beams, namely 10 MV photons (doses up to 40 Gy), 10 MeV and 6 MeV electrons (doses up to 30 Gy). The investigation of the film response to the MeV electron beam irradiation was carried out due to our interest to intraoperative radiotherapy (IORT). The delivered dose for this treatment modality amounts 10–22 Gy per single fraction according to Ref. [10].

Material and methods

Gafchromic EBT3 film

Gafchromic EBT3 polymer films are widely used as a reliable secondary dosimeter due to the facts that film effective atomic number ($Z_{eff}^{EBT} = 6.84$) is close to the water one ($Z_{eff}^{water} = 7.3$); the film is self-developing and the spatial resolution lies in the sub-millimeter range while using flatbed scanner [4, 11].

Interaction of the ionizing radiation with the film results in the film darkening that could be expressed using net optical density value:

$$NetOD = \log \frac{PV_{before} - PV_{bckg}}{PV_{after} - PV_{bckg}} \quad (1)$$

where PV is the pixel value as read by the scanner, and indexes *before*, *after* и *bckg* denotes film before irradiation, after irradiation and scanner background caused mainly by dark current [12]. The film darkening is caused by polymerization of the monomers in it under irradiation that defines the maximal achievable spatial resolution and time that is needed for film processing.

The Gafchromic EBT3 film consists of a single active layer with nominal thickness equal to 28 μm that is situated between two protective polyester layers with nominal thicknesses equal to 12 μm each. Thus, the third generation of the film is insensitive to the film overturn upside down during the scanning procedure according to [13]. The film characteristics could vary from a batch to a batch that should be taken into account. During our experimental study we used the films with the batch number № 04041202.

Calibration routine

Because of film non-uniformity each pixel could darken to a different value during film irradiation. Stochastic process during scanning procedure adds uncertainty to each pixel value. It is hardly possible to predict the exact value of this uncertainty during the measurement of the dose spatial distribution of the highly gradient field. However, it is still possible to estimate the expected uncertainty value of the whole system while irradiating the films by the uniform flat fields. In our research we combined Gafchromic EBT3 calibration procedure that assumes the use of flat fields with estimation of the measured dose uncertainty caused by the film non-uniformity and scanner processes. In our assumption such an approach could help a lot to have at least a feeling of relative dose error expected during the film irradiation by the arbitrary fields.

The film calibration procedure is needed to assign the absorbed dose with the film net optical density. One should be aware that each particular dosimetric system that includes radiation source, radiation conditions, detectors, scanner model could have different reply and in the most of the cases should be calibrated as a whole system. Change of any component may result in a necessity of new calibration. In the case of the film dosimetry one could use different color channels (red, green, blue) that usually have different reaction to the irradiation. This is the basis of multichannel dosimetry that is widely developed these days [14]. However, in our work we used red and green channels of the film separately for better understanding of their difference that should be taken into account during multichannel dosimetry.

Procedure of the film calibration can be divided into two stages. At the first step the radiation source is calibrated using the ionization chamber following the routines described in protocols TRS-398 or TG-51 [5, 6]. At the second step the characterized radiation source is used for irradiation of the film pieces that should be

situated at the same conditions as the ionization chamber before. One of the conditions of the film calibration routine is its irradiation in the flat field that is at least twice larger than the film size in order to avoid penumbra influence. The fact that the film is irradiated by the flat field allows combining film calibration and relative dose uncertainty evaluation.

During our experiments we irradiated film pieces $5 \times 5 \text{ cm}^2$ using the field size $10 \times 10 \text{ cm}^2$. The irradiated film pieces were scanned in transmission regime 24 hours after the irradiation in order to finish self-development process. The scanning was carried out at 150 dpi resolution and the color depth was chosen to be equal to 48-bit (16-bit per color channel using RGB mode). Region of interest (ROI) was used for obtaining of data for calibration curve. Following Refs. [15–17] the ROI was chosen to be equal to $1 \times 1 \text{ cm}^2$ in the center of the field resulting in approximately 3600 pixels that were used for calibration. This ROI was also used for estimation of statistical uncertainty of the measured pixel value.

Net optical density was obtained from averaged pixel value (\overline{PV}_i) taken from the scanned film ROI basing on Eq. (1). Knowledge of pixel value standard deviation (σ_{PV_i}) allows obtaining uncertainty of the net optical density σ_{NetOD} in the following form:

$$\sigma_{NetOD} = \sqrt{\sum_i \left(\frac{\sigma_{PV_i}}{\sigma_{x_i}} \right)^2 \Delta x_i^2} \quad (2)$$

where x_i are the variables in the Eq. (1) and Δx_i^2 are their uncertainties.

Dependence of the absorbed dose on film net optical density, namely the calibration curve could be described by the following equation [12]:

$$D_{fit} = a \times NetOD + b \times (NetOD)^n \quad (3)$$

where a, b, n are the free fit parameters.

The uncertainty of the dose definition based on calibration curve is given by the following equation [12]:

$$\begin{aligned} \sigma_{D_{fit}} = & [NetOD^2 \times \sigma_a^2 + NetOD^{2n} \times \sigma_b^2 + \\ & + (b \times NetOD^n \times \log NetOD)^2 \times \sigma_n^2 + \\ & + (a + n \times b \times NetOD^{n-1})^2 \times \sigma_{NetOD}^2]^{0.5} \end{aligned} \quad (4)$$

where σ_a, σ_b and σ_n are the uncertainties of the fit parameters a, b, n respectively.

Algorithm of uncertainty calculation

The scanned data treatment program code was developed using Wolfram Mathematica software [17].

The film calibration routine assumes irradiation of the film pieces by the flat field. This fact allows us to estimate the statistical changes in the film darkening due to random

reasons both is the film and in the scanned image. The following algorithm has been developed:

1. The starting point of the data treatment was the scanned film pieces in the 48-bit TIFF format. In our experiment each film piece was irradiated by the known dose D_{ref} and scanned before irradiation and 24 hours after the irradiation. Thus, the sets of values $PV_{after,i}$, $PV_{before,i}$ at each i -th pixel of the film within the whole film piece were obtained. The values of PV_{bckg} and $\sigma_{PV_{bckg}}$ were obtained at advance from the scanning of the dark field (the scanner lamp was closed by the opaque screen).

2. As the next step the ROI was defined. The average pixel values and their uncertainties were calculated within ROI resulting in average values \overline{PV}_{after} and \overline{PV}_{before} , as well as their standard deviations $\sigma_{PV_{after}}$ and $\sigma_{PV_{before}}$. While calculating the standard deviations the points within ROI where $\overline{PV} - 5\sigma_{PV} < PV_i < \overline{PV} + 5\sigma_{PV}$ were not taken into account in order to avoid standard deviation overestimation due to artifacts. Such values were changed by the mean value of two nearest pixels. The cleaning procedure was iterative and two iterations were enough in our case.

3. Basing on obtained pixel values the average $NetOD$ value and its standard deviation σ_{NetOD} were obtained.

4. Experimental calibration curve (dependence of D_{ref} on $NetOD$) was fitted by Eq. (3), resulted in fit parameters a, b, n and their uncertainties. The fit was based on the least squares algorithm using Wolfram Mathematica built-in function NonlinearModelFit based on Levenberg-Marquardt algorithm.

5. The film pieces irradiated during the calibration procedure were assumed to be irradiated by the unknown dose D_{fit} . Based on the film $NetOD$ value and calibration curve the dose of irradiation D_{fit} was calculated. Based on the fit uncertainties obtained earlier and σ_{NetOD} value the dose uncertainty $\sigma_{D_{fit}}$ was calculated using Eq. (4). The relative dose uncertainty $\sigma_{D_{fit}} / D_{fit}$ was the main point of interest that described the expected error values caused by combination of the local film inhomogeneity, stochastic scanning processes and random reasons.

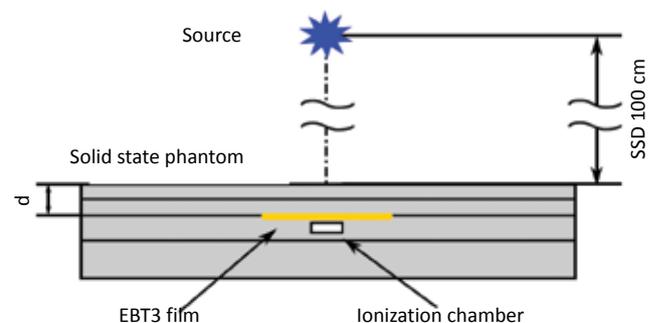


Fig. 1. Film irradiation scheme used both at the Elekta Axesse accelerator for electron and photon beams and at the betatron

Experimental equipment

Experimental irradiation of the Gafchromic EBT3 films was carried out using 10 MV photon beam and 10 MeV electron beam of the Elekta Axesse accelerator (Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia) and 6 MeV electron beam of betatron for IORT (Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia).

Elekta Axesse irradiation procedure

The films were irradiated by 10 MV photon beam in the dose range 0.5–40 Gy and by the 10 MeV electron beam in the dose range 0.5–30 Gy. Fig. 1 shows the general irradiation scheme used both at Elekta Axesse accelerator for electron and photon beams and at IORT betatron.

The film pieces with sizes 5×5 cm² were irradiated in the standard conditions: field size was equal to 10×10 cm², and Source-Axis Distance (SAD) amounted 100 cm. The accelerator dose rate was equal to 460 ± 50 MU/min, resulting in 4.6 ± 0.5 Gy/min. Each film piece was irradiated perpendicular to the beam axis in the solid state phantom MatriXX (Ser.No.13042, IBA Dosimetry, Germany) [18].

Due to the fact that Elekta Axesse accelerator was calibrated earlier with respect to dose depth distributions the irradiation dose was controlled by internal dosimeter (MU values). The reference dose was measured using clinical dosimeter DOSE1 (DOSE-1) [19] and cylinder ionization chamber Farmer FC65-P (S/N 2519).

The dose depth distribution maximum at 10 MV photon beam was situated at $d = 2.6$ cm depth in the solid phantom. For 10 MeV electron beam the same value amounted $d = 2.2$ cm. The film pieces were situated at these depths.

In order to obtain reference doses from ionization chamber D_{ref} all routine procedures were carried out according to TRS-398 and TG-51 protocols [5, 6]. For the 10 MV photon beam the value $\%dd(10)_x = 73$ % and $TPR_{10,20} = 0.738$ resulting in $k_Q = 0.985$ both for TG-51 and TRS-398 protocols. In the case of 10 MeV electron beam the beam quality factor $R_{50} = 4.33$ g/cm² resulting in $k_Q^{TRS-398} = 0.898$ according to TRS-398 [5] and $k_Q^{TG-51} = 0.894$ according to TG-51 [6]. Since the difference is less than 0.5 % we decided to use the quality factor value defined by TRS-398 protocol.

Betatron irradiation procedure

For the film irradiation 6 MeV betatron developed at Tomsk Polytechnic University for IORT was used. The calibration of the betatron was carried out using UNIDOS-E dosimeter (PTW Freiburg, Germany) [20], plane-parallel ionization chamber PTW 23343 Freiburg Markus PTW Freiburg, Germany) [21] and solid state phantom RW3 Slap Phantom T29672 [22]. Due to the fact that the internal dose control unit had not been developed up to the experiment, the irradiation dose was controlled by irradiation time. At the first stage the dose

was measured by ionization chamber versus time and at the second stage the films were irradiated during the same time using the ionization chamber to control dose stability. The irradiation scheme is shown in Fig. 1. The difference was the presence of applicator with diameter 8 cm installed between radiation output window and phantom surface.

The films were irradiated in the dose range 1–25 Gy. The dose depth distribution maximum in the solid stated phantom was situated at the depth $d = 1.0$ cm. The beam quality factor $R_{50} = 2.2$ g/cm² resulting in $k_Q^{TRS-398} = 0.924$ according to TRS-398 [5] and $k_Q^{TG-51} = 0.941$ according to TG-51 [6]. Due to the significant difference in the values we decided to use the mean value of k_Q quality factor equal to $k_Q = 0.933$. Significant difference of the k_Q values obtained from the same dose depth curve using different protocols is very interesting. However, investigation of this fact is out of the scope of this paper.

Scanner

For the film scanning Epson Perfection V750 Pro scanner was used [23]. The films were scanned at 150 dpi resolution in 48-bit color mode. The scanner background average values and their uncertainties amounted: $PV_{bckg}^r = 570 \pm 80$, $PV_{bckg}^g = 630 \pm 81$, $PV_{bckg}^b = 540 \pm 66$. Indexes r , g , b define «red», «green» and «blue», respectively. Uncertainty values are given at confidence interval $p = 0.95$.

Results

Photon beam of Elekta Axesse accelerator

During the film calibration at 10 MV photon beam of Elekta Axesse accelerator the following calibration fitting equations for red and green channels were obtained:

$$D_{fit}^r(x) = (11.8 \pm 0.6) \times x + (79 \pm 3.8) \times x^{(6.3 \pm 0.3)}$$

$$D_{fit}^g(x) = (16.9 \pm 0.5) \times x + (30 \pm 0.4) \times x^{(2.7 \pm 0.07)} \quad (5)$$

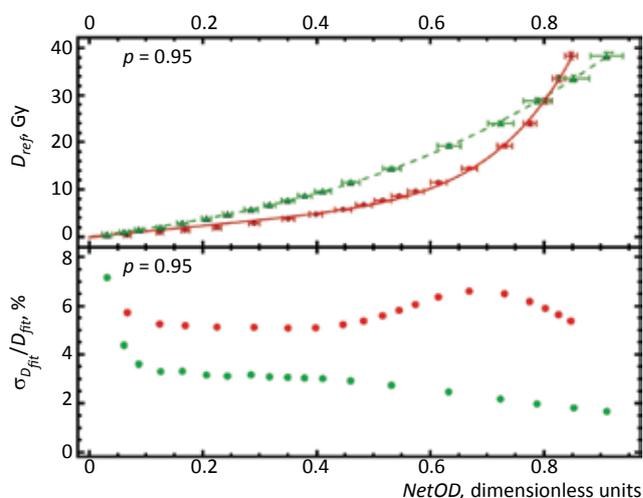


Fig. 2. Calibration dependences and fitting curves according to Eq. (5) obtained at 10 MV photon beam of Elekta Axesse (upper plot). Relative uncertainty of absorbed dose calculated from calibration curves Eq. (5) (lower plot). Red dots – red channel, green dots – green channel, lines – fit curves

Fig. 2 shows the experimental calibration dependences and calibration curves given by Eq. (5). The error bars in dose values were assumed to be 2 % according to TRS-398 [5]. Error bars in $NetOD$ values were calculated at confidence interval $p = 0.95$.

Fig. 2 and uncertainty values in Eq. (5) shows that green channel better fits the experimental data.

Lower plot in Fig. 2 shows the dependence of relative dose uncertainty on net optical density for both red and green channels at confidence interval $p = 0.95$ that was calculated using Eq. (4). In Fig. 2 one can see that the values of relative dose uncertainty lie within 7 % level for both channels. For red channel uncertainty varies in the range 5–7 % for the whole range of $NetOD$ values. For green range the dose uncertainty decreases with increase of $NetOD$ values and lies within 5 % range for doses larger than 1 Gy.

Electron beam of Elekta Axesse accelerator

During the film calibration at 10 MeV electron beam of Elekta Axesse accelerator the following calibration fitting equations for red and green channels were obtained:

$$\begin{aligned} D_{fit}^r(x) &= (10.2 \pm 0.3) \times x + (56 \pm 2) \times x^{(4.8 \pm 0.16)} \\ D_{fit}^g(x) &= (16.2 \pm 0.3) \times x + (29 \pm 0.2) \times x^{(2.46 \pm 0.05)} \end{aligned} \quad (6)$$

Fig. 3 shows the experimental calibration dependences and calibration curves given by Eq. (6). The error bars in dose values were assumed to be 2 % according to TRS-398 [5]. Error bars in $NetOD$ values were calculated at confidence interval $p = 0.95$.

Lower plot in Fig. 3 shows the dependence of relative dose uncertainty level on net optical density for both red and green channels at confidence interval $p = 0.95$. In Fig. 3 one can see that the values of relative dose

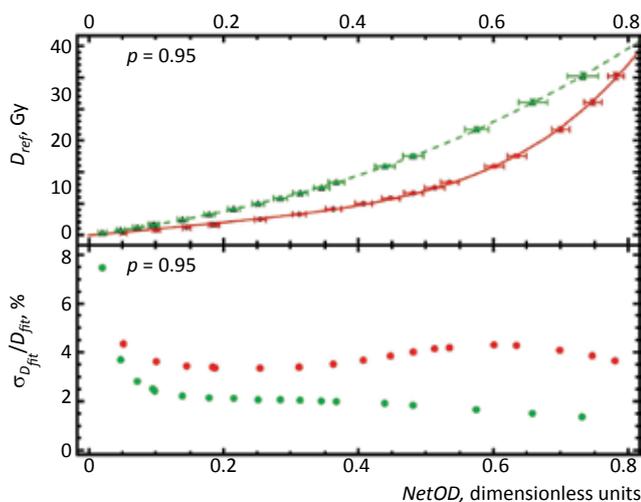


Fig. 3. Calibration dependences and fitting curves according to Eq. (6) obtained at 10 MeV electron beam of Elekta Axesse (upper plot). Relative uncertainty of absorbed dose calculated from calibration curves Eq. (6) (lower plot). Red dots – red channel, green dots – green channel, lines – fit curves

uncertainty lie within 7 % level for both channels. For red channel uncertainty varies in the range 3.5–5 % for the whole range of $NetOD$ values. For green range the dose uncertainty decreases with increase of $NetOD$ values and lies within 4 % range for doses larger than 1 Gy.

Electron beam of betatron

During the film calibration at 6 MeV electron beam of betatron the following calibration fitting equations for red and green channels were obtained:

$$\begin{aligned} D_{fit}^r(x) &= (10.3 \pm 0.3) \times x + (59.2 \pm 2.6) \times x^{(4.61 \pm 0.16)} \\ D_{fit}^g(x) &= (16.5 \pm 0.5) \times x + (34.2 \pm 0.7) \times x^{(2.59 \pm 0.09)} \end{aligned} \quad (7)$$

Fig. 4 shows the experimental calibration dependences and calibration curves given by Eq. (7). Error bars in $NetOD$ values were calculated at confidence interval $p = 0.95$.

Lower plot in Fig. 4 shows the dependence of relative dose uncertainty level on net optical density for both red and green channels at confidence interval $p = 0.95$. In Fig. 4 one can see that the values of relative dose uncertainty lie within 5.2 % level for both channels. For red channel uncertainty varies in the range 3.5–5 % for the whole range of $NetOD$ values. For green range the dose uncertainty decreases with increase of $NetOD$ values and lies within 4 % range for doses larger than 1 Gy.

Comparison of calibration curves

In order to compare film response to different kinds of radiation the dependences of curves ratios were plotted versus $NetOD$ values. Fig. 5 shows comparison of calibration curves obtained at electron (10 MeV) and photon (10 MV) beams of Elekta Axesse accelerator taking into account the uncertainties of calibration both for red and green channels.

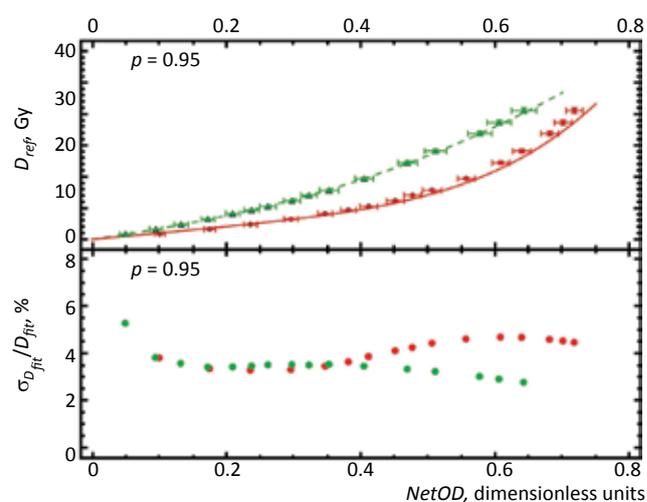


Fig. 4. Calibration dependences and fitting curves according to Eq. (7) obtained at 6 MeV electron beam of IORT betatron (upper plot). Relative uncertainty of absorbed dose calculated from calibration curves Eq. (7) (lower plot). Red dots – red channel, green dots – green channel, lines – fit curves)

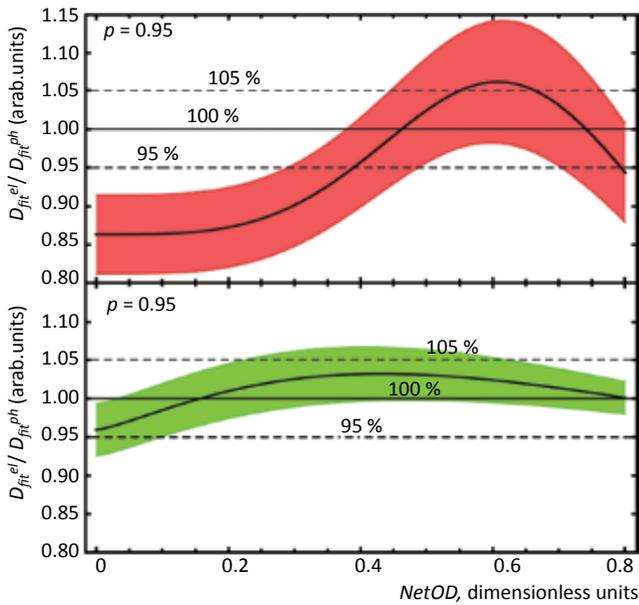


Fig. 5. Ratio of calibration curves obtained at 10 MeV electron beam and 10 MV photon beam of Elekta Axesse accelerator. Color region show uncertainty region due to uncertainties of calibration curves. Upper plot – red channel, lower plot – green channel

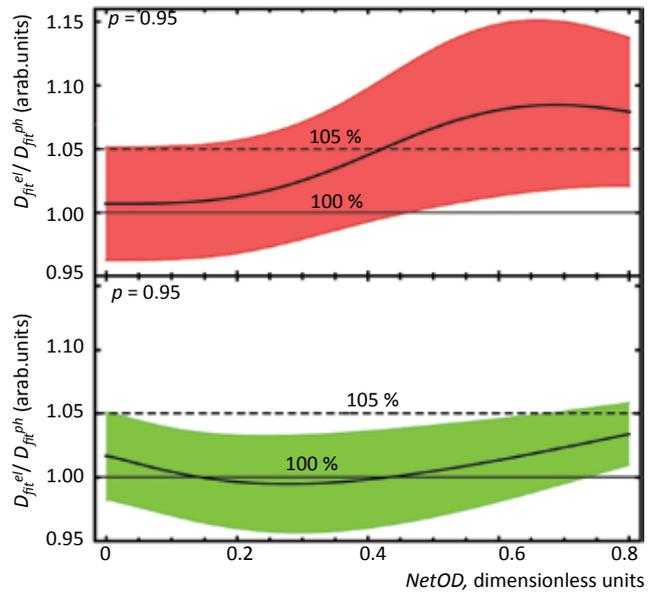


Fig. 6. Ratio of calibration curves obtained at 10 MeV electron beam of Elekta Axesse accelerator and 6 MeV electron beam of IORT betatron. Color region show uncertainty region due to uncertainties of calibration curves. Upper plot – red channel, lower plot – green channel

In Fig. 5 one can see that ratio of calibration curves for the red channel lies in the range 0.86–1.06, and maximal uncertainty value amounts $\pm 8\%$ in the range of net optical density values $NetOD \approx 0.6$. Green channel coincidence is better resulting in the ratio values 0.96–1.04 and maximal uncertainty $\pm 4\%$ ($NetOD \approx 0.5$).

Fig. 6 shows comparison of calibration curves obtained at electron beams of Elekta Axesse accelerator (10 MeV) and electron beam of betatron (6 MeV) taking into account the uncertainties of calibration both for red and green channels.

In Fig. 6 one can see that ratio of calibration curves lies in the range 0.96–1.09 for the red channel, and in the range 0.96–1.06 for the green one.

Discussion

Polymer radiochromic film Gafchromic EBT3 was calibrated at electron and photon beams of two different accelerators. The uncertainties of the absorbed dose values calculated from the measured $NetOD$ values using calibration curves (D_{fit}) were obtained taking into account statistical distribution of the measured PV within ROI.

The results of film calibration both at electron (10 MeV) and photon (10 MV) beams of Elekta Axesse linear accelerator show that the film response to different kinds of radiation is similar i.e. there is no significant difference between calibration curves for electron and photon beams. Both calibration curves were fitted well by the curve type, described by Eq. (3). The results of film calibration at electron beams of different energy (10 MeV

and 6 MeV) show that the film response to different particle energy is similar i.e. there is no significant difference between calibration curves.

In comparison with results of Gafchromic EBT2 film obtained in Ref. [8] our results show that Gafchromic EBT3 film dose measurement uncertainties are less than Gafchromic EBT2 ones being within 5%. Obtained uncertainties of unknown dose measurement show that film green channel is better while irradiating films to the dose values higher than 1 Gy due to the fact that uncertainty values lie within 4% range (at $p = 0.95$). Such uncertainty level allows to use the film for absolute dose measurement. In our opinion the difference between red and green channels should be taken into account while using film multichannel dosimetry.

If one irradiates a film by the dose equal to 1 Gy the following uncertainties values could be obtained. Uncertainties caused by fitting curve error: $\Delta D_r^{ph} = \pm 5\%$, $\Delta D_g^{ph} = \pm 3\%$, $\Delta D_r^{el} = \pm 3.2\%$, $\Delta D_g^{el} = \pm 1.8\%$. If one additionally takes into account statistical distribution within ROI the following uncertainty values could be obtained: $\Delta D_r^{ph} = \pm 5.5\%$, $\Delta D_g^{ph} = \pm 4.5\%$, $\Delta D_r^{el} = \pm 3.7\%$, $\Delta D_g^{el} = \pm 3.2\%$. Such high level of local inhomogeneity uncertainty does not allow measuring absorbed doses less than 10 cGy (uncertainty amounts 15%). Uncertainty values for the doses larger than 20 Gy lie within 5% that extends manufacturer information.

Conclusion

The polymer Gafchromic EBT3 films could be used for absorbed dose measurement for the doses not less than 0.5 Gy. For lower dose values the dose measurement uncertainty caused by statistical reasons amounts 15 %. For dose values of about 1 Gy and higher the dose measurement uncertainty amounts 5 % that allows to use the films for transverse and longitudinal prescription treatment dose distribution measurement with very high spatial resolution.

Acknowledgment

Authors would like to thank P. Filatov for valuable help during irradiation of the films at the Elekta Axesse linear accelerator. The work was partly supported by the Competitiveness enhancement program of Tomsk Polytechnic University.

REFERENCES

- Syed YA, Petel-Yadav AK, Rivers C, Singh AK. Stereotactic radiotherapy for prostate cancer: A review and future directions. *World J Clin Oncol.* 2017;8(5):389-97. DOI: 10.5306/wjco.v8.i5.389.
- Diot Q, Kavanagh B, Timmerman R, Miften M. Biological-based optimization and volumetric modulated arc therapy delivery for stereotactic body radiation therapy. *Med Phys.* 2012;39(1):237-45. DOI: 10.1118/1.3668059.
- Fiorentino A, Giaj-Levra N, Tebano U, et al. Stereotactic ablative radiation therapy for brain metastases with volumetric modulated arc therapy and flattening filter free delivery: feasibility and early clinical results. *Radiol Med.* 2017;122(9):676-82. DOI: 10.1007/s11547-017-0768-0.
- Gafchromic. Gafchromic EBT3 film specifications. [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb. 20]. Available from: http://www.gafchromic.com/documents/EBT3_Specifications.pdf.
- Andreo P, Burns D, Hohlfeld K, et al. Absorbed dose determination in external beam radiotherapy: An international code of practice for dosimetry based on standards of absorbed dose to water. Technical Report Series no. 398. IAEA. 2000:251.
- Almond P, Biggs P, Coursey B, et al. AAPM's TG-51 protocol for clinical reference dosimetry of high-energy photon and electron beams. *Med. Phys.* 1999;26(9):1847-70.
- Sorriaux J, Kacperek A, Rossomme S, et al. Evaluation of gafchromic ebt3 films characteristics in therapy photon, electron and proton beams. *Physica Medica.* 2013;29. Suppl.6:599-606. DOI: 10.1016/j.ejmp.2012.10.001.
- Hartmann B, Martisikova M, Jakel O. Technical note: Homogeneity of Gafchromic EBT2 film. *Med Phys.* 2010;37. Suppl.4:1753-6. DOI: 10.1118/1.3368601.
- Niewald M, Fleckenstein J, Licht N, et al. Intraoperative radiotherapy (IORT) combined with external beam radiotherapy (EBRT) for soft-tissue sarcomas – a retrospective evaluation of the homburg experience in the years 1995-2007. *Radiat Oncol.* 2009;4. Suppl.32:1-6. DOI: 10.1186/1748-717X-4-32.
- Niroomand-Rad A, Blackwell C, Coursey B, et al. Radiochromic film dosimetry: Recommendations of AAPM radiation therapy committee task group 55. *Med Phys.* 1998;25. Suppl.11:2093-115. DOI: 10.1118/1.598407.
- Devic S, Seuntjens J, Hegyi G, et al. Dosimetric properties of improved gafchromic films for seven different digitizers. *Med Phys.* 2004;31. Suppl.9:2392-401. DOI: 10.1118/1.1776691.
- Butson M, Yu P, Cheung T, Alnawaf H. Energy response of the new EBT2 radiochromic film to x-ray radiation. *Radiat Measur.* 2010;45. Suppl.7:836-9. DOI: 10.1016/j.radmeas.2010.02.016.
- Micke A, Lewis D, Yu X. Multichannel film dosimetry with nonuniformity correction. *Med Phys.* 2011;38. Suppl.5:2523-34. DOI: 10.1118/1.3576105.
- Devic S. Radiochromic film dosimetry: Past, present, and future. *Physica Medica.* 2011;27. Suppl.3:122-34. DOI: 10.1016/j.ejmp.2010.10.001.
- Soares C. Radiochromic film dosimetry. *Radiat Measur.* 2006;41. Suppl.1:S100-S116.
- Reinhardt S, Hillbrand M, Wilkens J, Assmann W. Comparison of gafchromic EBT2 and EBT3 films for clinical photon and proton beams. *Med Phys.* 2012;39. Suppl.8:5257-62. DOI: 10.1118/1.4737890.
- Wolfram. [Internet]. 2019. [cited 2019, Feb. 20]. Available from: <https://www.wolfram.com/mathematica>.
- IBA. Description of dosimetric system iba matrix. [Internet]. 2019. [cited 2019, Feb. 20]. Available from: <http://www.iba-dosimetry.com/complete-solutions/radiotherapy/imrt-igrt-rotational-qa/matrixxes>.
- IBA. Description of clinical dosimeter dose-1. [Internet]. 2017. [cited 2019, Feb. 20]. Available from: http://www.iba-dosimetry.com/sites/default/files/resources/RT-BR-E-DOSE1_Rev.1_0211_0.pdf.
- PTW, Description of dosimeter ptw unidos E. [Internet]. 2017. [cited 2019, February 20]. Available from: http://www.ptw.de/unidos_e_dosemeter_ad0.html.
- PTW, Description of electron ionization chamber PTW23343. [Internet]. 2017. [cited 2019, Feb. 20]. Available from: http://www.ptw.de/advanced_markus_electron_chamber.html.
- PTW, Description of solid state phantom ptw rw3 SLAP phantom T29672. [Internet] 2017. [cited 2019, February 20]. Available from: http://www.ptw.de/acrylic_and_rw3_slab_phantoms0.html.
- Epson, Technical characteristics of EPSON Perfection V750 scanner. [Internet]. 2017. [cited 2019, Feb. 20]. Available from: <http://epson.ru/catalog/scanners/epson-perfection-v750-pro/?page=characteristics>.

For citation: Sukhikh ES, Sukhikh LG, Malikov EL, Izhevsky PV, Sheino IN, Vertinsky AV, Baulin AA. Uncertainty of Measurement Absorbed Dose by Gafchromic EBT3 Dosimeter for Clinical Electron and Photon Beams of Medical Accelerators. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2019;64(4): 56–63. (English). DOI: 10.12737/article_5d1b46c9133942.84705406

**Е.С. Сухих^{1,2}, Л.Г. Сухих², Е.Л. Маликов², П.В. Ижевский³, И.Н. Шейно³, А.В. Вертинский^{1,2},
А.А. Баулин^{2,4}**

Неопределенности поглощенной дозы, измеренной дозиметром Gafchromic EBТ3 на клинических электронных и фотонных пучках медицинских ускорителей*

1. Томский областной онкологический диспансер, Томск. E-mail: e.s.sukhikh@gmail.com;
2. Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск;
3. Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва;
4. Центр высокоточной радиологии «GAMMA CLINIC», ООО «Гамма Медтехнологии», Обнинск

Е.С. Сухих – начальник отдела, к.ф.-м.н., доцент, член ESTRO, член EFOMP, член ISRS;

Л.Г. Сухих – директор исследовательской школы физики высокоэнергетических процессов, д.ф.-м.н.;

Е.Л. Маликов – н.с.; П.В. Ижевский – в.н.с., к.м.н., доцент; И.Н. Шейно – зав. лаб., к.ф.-м.н.;

А.В. Вертинский – медицинский физик, аспирант; А.А. Баулин – медицинский физик, аспирант, член ISRS

Реферат

Цель: Исследовать величины относительных неопределенностей в измерении поглощенной дозы с помощью радиохромных полимерных пленок Gafchromic EBТ3 для клинических электронных и фотонных пучков медицинских ускорителей.

Материал и методы: Полимерные пленки Gafchromic EBТ3 калибровались на фотонном и электронном пучках медицинского ускорителя Elekta Axesse с энергией 10 МВ и 10 МэВ соответственно, а также на электронном пучке бетатрона для интраоперационной лучевой терапии с энергией пучка 6 МэВ. Пленки облучались в однородном дозном поле в диапазоне доз от 0,5 до 40 Гр. Величина поглощенной дозы в процессе калибровки контролировалась цилиндрической ионизационной камерой на линейном ускорителе Elekta Axesse и с помощью плоскопараллельной ионизационной камеры типа Markus на бетатроне. Облученные пленки сканировались с помощью планшетного сканера Epson Perfection V750 Pro с глубиной цвета 16 бит на канал (цветовая модель RGB) при пространственном разрешении 150 точек на дюйм (dpi). Для дальнейшего анализа использовались только красный и зеленый цветовые каналы. Для расчета средней величины чистой оптической плотности и ее среднеквадратичного отклонения исследовалась центральная часть каждой из пленок. При построении калибровочной кривой пленки, т.е. зависимости референсной поглощенной дозы, измеренной ионизационной камерой, от чистой оптической плотности, использовались неопределенности измеренной дозы и оптической плотности.

Результаты: Относительная неопределенность измеренной с помощью пленки дозы лежит в пределах 7 % для низких значений доз (менее 1 Гр) и в пределах 4 % для высоких значений доз. Зеленый канал цветности оказался менее чувствительным к ионизирующему излучению, однако величина относительной неопределенности оказалось в среднем на 1–2 % ниже, чем у красного канала. Использование разных источников излучения для калибровки привело к разным калибровочным кривым с разницей до ± 6 % (для зеленого канала).

Заключение: Полимерные пленки Gafchromic EBТ3 могут быть использованы для измерения значений поглощенной дозы не менее 0,5 Гр. Для более низких значений дозы неопределенность измеренных значений, обусловленная статистическими причинами, составляет более 15 %. При значениях дозы порядка 1 Гр и более, неопределенность измерений дозы составляет 5 %, что позволяет использовать пленки для измерения поперечного и продольного распределения дозы с очень высоким пространственным разрешением.

Ключевые слова: лучевая терапия, пленки Gafchromic EBТ3, клиническая дозиметрия, медицинские ускорители, поглощенная доза, неопределенности

Поступила: 25.03.2019. Принята к публикации: 21.05.2019

* Полный русскоязычный вариант статьи размещен на сайте журнала «Медицинская радиология и радиационная безопасность» <http://www.medradiol.ru> в разделе «Выпуск № 4 2019 года».

Для цитирования: Сухих Е.С., Сухих Л.Г., Маликов Е.Л., Ижевский П.В., Шейно И.Н., Вертинский А.В., Баулин А.А. Неопределенности измеренной поглощенной дозы дозиметром Gafchromic EBТ3 на клинических электронных и фотонных пучках медицинских ускорителей // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 56–63.

DOI: 10.12737/article_5d1b46c9133942.84705406

Hyperthermia for Deep Seated Tumours – Possibilities of Heating with Capacitive Devices

O.K. Kurpeshev¹, J. Van der Zee², M. Cavagnaro³

1. Siberian Scientific Research Institute of Hyperthermia, Novosibirsk region, Iskitim-5, Russia;
2. Erasmus Medical Centre, University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, Netherlands;
3. Sapienza University, Rome, Italy

O.K. Kurpeshev – PhD, MD, consultant; J. Van der Zee – PhD, MD, Member of European Society for Hyperthermic Oncology (ESHO); M. Cavagnaro – Prof., PhD, Member of the Societies of the Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), the European Society for Hyperthermic Oncology (ESHO) and the European Association of BioElectromagnetics (EBEA)

Contents

The review examines the general principles of capacitive electromagnetic hyperthermia (EMHT), the distribution of electromagnetic energy in various experimental models and in patients' tumors, the design features of applicators from various capacitive hyperthermic systems and their role in achieving hyperthermic mode in tumors of deep localization. In classical capacitive EMHT, the main obstacle in achieving the required temperature in such tumors is overheating of the subcutaneous fatty tissue under the electrodes. For some capacitive hyperthermic systems, the heating of adipose tissues is enhanced due to the fact that the applicator design does not conform to certain technical requirements. In capacitive EMHT at frequencies of 8–13.56 MHz, obtaining the minimum hyperthermic mode is possible with output powers of 500–800 W, maximum – 1000–1200 W and above.

The results of the use of various hyperthermic capacitive systems in patients with malignant tumors of internal organs are analyzed.

Key words: *radiation therapy, chemotherapy, thermoradiotherapy, thermochemotherapy, thermochemoradiation therapy, electromagnetic fields, hyperthermia, capacitive devices*

Article received: 20.02.2019. Accepted for publication: 21.05.2019

Abbreviations

HT – hyperthermia
RT – radiation therapy
LRHT – loco-regional HT
CT – chemotherapy
CRT – chemoradiotherapy
EMHT – electromagnetic HT
SAR – specific absorption rate
EM – electromagnetic
SCF – subcutaneous fat
RFHT – radiofrequency HT

Introduction

Experimental and clinical studies have shown that loco-regional hyperthermia (LRHT) at temperatures of 40–46 °C is a powerful adjuvant of radio- (RT), chemo- (CT) and chemoradiotherapy (CRT). This is explained by the variety of its biological actions: direct cell kill, radio-, chemo- and immunomodulation, as well as suppressing the development of drug resistance of tumor cells [1–17]. In most studies, the dependence of the results of hyperthermia (HT) on the temperature level and the duration of heating, i.e. on the heat dose, has been demonstrated [8, 18–23]. For LRHT, electromagnetic field (EMF) in the microwave and radio frequency range is mainly used. With EMHT, the intensity of heat generation and the temperature distribution depends on the dielectric and thermodynamic properties of the tissues, the blood perfusion, and the method of heating. Therefore, there is a variation in temperature in the heated volume of tissue and it may change during the HT session. Thermometry is mainly carried out by invasive methods, by introduction of thermal sensors into the tumor. In clinical conditions

however, this method of thermometry does not allow the evaluation of the quality of treatment very well, since the number of thermometry sensors introduced into the tumor is limited, and temperature indicators are largely dependent on their location.

The quality of EMHT depends on the degree of temperature rise in the entire heated volume and the temperature distribution in the tumor. The most recent European Society for Hyperthermic Oncology (ESHO) guidelines for deep LRHT prescribe a temperature increase of preferably 1 °C per 5 min heating, ranging from 0.6 to 2.0 °C. In the calculated SAR (specific absorption rate) distribution, the ratio between the average SAR in the target and the average SAR in non-target should be at least 1.5, and the maximum SAR in 0.1 % of the total volume of normal tissue (hot spot) not larger than 4 times the SAR in the target [24]. With an excessive accumulation of energy in certain parts of normal tissues, so-called hot spots are formed. In this case, patients subjectively feel a burning sensation and pain under the applicators, which do not allow a further increase in output power, respectively, temperature in the tumor [25].

In hyperthermic oncology, tumors, according to the depth of location, are divided into 3 types: superficial (up to 3 cm in depth), subsurface (up to 3–6 cm deep) and deep (more than 6 cm) [26]. HT of superficial tumors is mainly carried out with the help of installations generating microwave radiation (434–915 MHz), and the required temperature level is achieved without special difficulties. While the creation of a hyperthermal regime in subsurface and deep tumors, especially internal organs, is problematic. For these purposes, radiofrequency HT (RFHT) is used and the energy is supplied to the target in two ways: multi-phase irradiation and capacitive. In

multi-phase irradiation heating, the effect of RF radiation (70–120 MHz) on the tumor is carried out using 4–8 synchronously operating antennas. They are enclosed in a frame in the form of a ring or ellipse, placed around the treated area of the patient's body. To achieve maximum energy in the target, the phase and output power are adjusted for each antenna separately. In capacitive heating, an alternating EM power (8–40.68 MHz) is created between two or three electrodes opposite each other or at an angle.

This review analyzes the possibilities of heating deep seated tumors using the capacitive RFHT method of various hyperthermia systems.

Capacitive hyperthermic systems

In clinical practice, mainly 2-electrode capacitive HT devices are used. There are 3-electrode, as well as coplanar types, that is, 2 multipolar annular or flat electrodes located in one plane [27, 28]. However, these did not find application in the clinic. In recent years, there was a 2-channel, 4-electrode installation on which only experimental studies were started [29]. In all capacitive hyperthermic systems, the electrode device has a similar construction: on its working surface there is an insert filled with circulating fluid with a high dielectric constant. The side of the insert adjacent to the patient's body is covered with an elastic membrane, which allows you to effectively cool and level the body irregularities in the heating zone. The electrode and the insert form the applicator as a whole. Sometimes, in order to better fill the space between of the applicator and the patient's body, additional bags (boluses) with water are used.

Currently there are 5 capacitive systems that are commercially available internationally: Synchrotherm (13.56 MHz), Andromedic (13.56 MHz), Oncothermia EHY-2000 (13.56 MHz), Thermotron RF-8 (8 MHz) and Celsius TCS (13.56 MHz). The remaining systems relate to experimental installations, or concern devices for which further information is not available (in particular, systems produced in China).

The **Synchrotherm RF** (13.56 MHz) and **Andromedic** (13.56 MHz) devices were designed in Italy and are rather similar. They are equipped with 2–3 pairs of round applicators of different diameters. Heating is carried out by the classical capacitive method. The maximum output power is 600 watts. The water temperature in the applicators can be adjusted from 6 °C to 20 °C. These installations have four major drawbacks. The first – is that the electrodes are made of a bending material, the second – is that during the HT session, the pair of electrodes are not fixed rigidly relative to each other. This design can create an unstable and unparallel placement of the electrodes on the patient's body, and thereby an uncontrolled distribution of the EM field, which may result in the development of burns on the skin, and/or underheating

of the tumor. Thirdly, the applicators are attached to the patient's body using a bandage that interferes with visual monitoring of the water level in them. Fourth, the bolus is as large as the electrode and thus a pronounced edge effect is present. In the available literature, we did not find data on tissue temperatures achieved with these systems, nor on results in cancer patients (to our knowledge, these installations are no longer being made).

The **Oncothermia** system was developed in Hungary and operates at 13.56 MHz. The system which has been installed most (EHY-2000) has a maximum output power of 150 W, other systems have a maximum power output of 250 W (EHY 2030) or 600 W (EHY 3010). Oncotherm systems have an active applicator with a diameter that range from 10 to 30 cm and a second passive applicator which is a large plate covering the entire upper surface of the couch, fixed and grounded. With such a large difference in the size of the electrodes, the energy is concentrated in the superficial tissues under the small electrode. The thickness of the applicator membrane is about 1.5 mm. Due to the large thickness of the membrane of the applicator, when water is circulated under pressure, during the HT procedure, a convex surface is created and thus the possibility of its close contact with the patient's body is excluded. Temperature control on this unit is not provided.

Celsius TCS (13.56 MHz), hereinafter Celsius, was developed in the Federal Republic of Germany and appeared on the medical equipment market in 2006. The unit has a maximum output power of 600 watts. Of the pair of electrodes, the upper one moves with the help of the bracket in horizontal and vertical directions, the lower one – only horizontally by manually moving it from one connector to the other. Thus, the electrodes in relation to the patient can be placed only vertically, a horizontal arrangement is not provided. To control the temperature, fiber-optic flexible thermal sensors are attached to the installation. The main disadvantage is also the high density of the applicator membrane, which has a thickness of about 1.5 mm. Therefore, during treatment under the pressure of circulating water, the membrane of the applicator acquires a convex shape and thereby reduces the area of contact of the applicator with the patient's body. This significantly impairs the main function of the bolus: smoothing out body irregularities and cooling the skin.

Thermotron RF-8 (8 MHz) was developed in Japan in the early 1980s. The unit has a maximum output power of 1500 W and is equipped with 6 pairs of applicator electrodes with a diameter of from 70 to 300 mm. A pair of applicators are enclosed in a 360-degree gantry frame and their displacement relative to the patient occurs synchronously in a circle in one plane. Temperature control is carried out by flexible or needle 1–4 element thermoresistance sensors. The membrane of the applicator has a thickness of about 0.7–0.8 mm. The temperature of

the circulating fluid in the applicator can be reduced to 5 °C.

The **Cancermia** system (8 MHz) was developed in South Korea and is mainly used for scientific purposes within the country, and there is no detailed information about its technical characteristics available.

The hyperthermic complexes **Superterm EP-40** (40.68 MHz) and **Extraterm (40.68 MHz)**, with a maximum output power of 600 W, was developed in Russia and from 1995 to 2017 was used for scientific purposes at the A.F. Tsyb MRRC. Devices were equipped with applicators of different sizes and shapes (round, rectangular) in the amount of up to 10 pairs on the installation Superterm EP-40, 6 pairs on the installation Extraterm. The applicators met the basic technical requirements: their membranes were made of latex rubber 0.6–0.8 mm thick, the side walls had the shape of a bellows (with corrugated ribs) and covered the electrode area by 1–3 cm.

General principles of capacitive HT and EM energy distribution in modeling or phantom measurements

The advantages of capacitive RFHT are mainly associated with the simplicity of the equipment and the heating procedure. The disadvantage is the overheating of the SCF under the electrodes due to the perpendicularly directed vector of the electric field on the surface of the body [30]. To reduce overheating of the acids, the salt water (0.4–1.0 %) with a temperature of 5–10 °C circulates in the applicator. With larger sizes of the applicator, compared with electrodes, it is possible to avoid overheating of the skin and along the edges of the electrodes, that is, to minimize the so-called edge effect. The cooling efficiency depends on a number of circumstances: the temperature of the circulating fluid in the applicators, the duration of the cooling before the HT procedure, the thickness of the SCF. Therefore, it is recommended to start cooling down 20–30 min before the beginning of HT with a thickness of SCF not more than 2 cm [30–35]. In model calculations and experiments on pigs, Kato H. et al. [34] the cooling effect was observed when the SCF thickness was up to 1.6 cm. According to Brezovich I.A. [30], with the thickness of SCF more than 1 cm, even preliminary cooling cannot bring about the desired result.

The dependence of the efficiency of cooling of the fat tissue is shown in fig. 1 [35].

From fig. 1 it follows that with pre-cooling the surface of the body of patients with water at 10 °C for 20 min, the temperature in the SCF decreases by approximately 3 °C when the thickness is 2–2.5 cm, by 5 °C when the thickness is 1.5 cm, and by 7.5 °C when the thickness is 0.5–1 cm. Thus, the largest effect of pre-cooling the SCF is seen at a thickness of less than 1 cm.

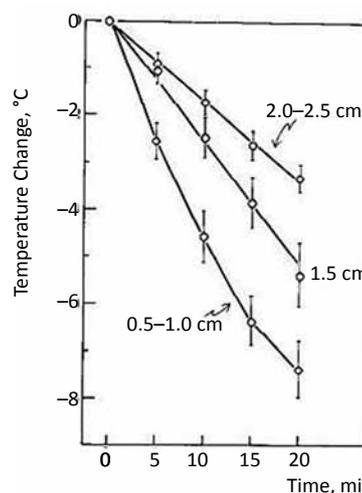


Fig. 1. The degree of cooling SCF with water at 10 °C, depending on its thickness

It should be borne in mind that the bolus can not always fill the space between the patient's skin and the electrode. When even small gaps appear between the applicator and the patient's body, SAR sharply increases on the skin of these areas [36]. To avoid such gaps, Brezovich I.A. et al. [31] recommends that the membrane material should be elastic and have an electrical conductivity, a thickness of 0.1 mm, and recommends further that the bolus should be circulated with 0.4 % saline solutions.

The distribution of absorbed EM power and the resulting temperature in the volume heated with a capacitive technique is determined, apart from the dielectric properties of the tissues and shape and dimension of the body, by the size of the electrodes, the distance between them and their location relative to each other [26, 31, 37, 38].

Of the capacitive hyperthermic systems, the most in-depth studies on the distribution of EMF in models and phantoms were carried out using the Thermotron RF8 [26, 34, 37–39] and a few on Celsius [40, 41].

In fig. 2, shows the temperature distribution at RFHT on the **Thermotron RF-8** device in a phantom of different volumes depending on the size of the electrodes [38]. The skin surface was cooled with water at a temperature of 20 °C.

As can be seen in fig. 2, with identical electrode diameters, which are commensurate with the thickness of the object being heated, considerable part of the energy reaches the deepest parts in a homogeneous volume. If the diameters of both electrodes are less than the thickness of the object, then heating occurs mainly under the electrodes. In case of using electrodes of different diameters, heating will predominantly take place under the smaller electrode. In this case, the larger the difference in electrode size is the more intense the heating will be under the small electrode, and in the center of the target less heat will be generated or it may be completely absent.

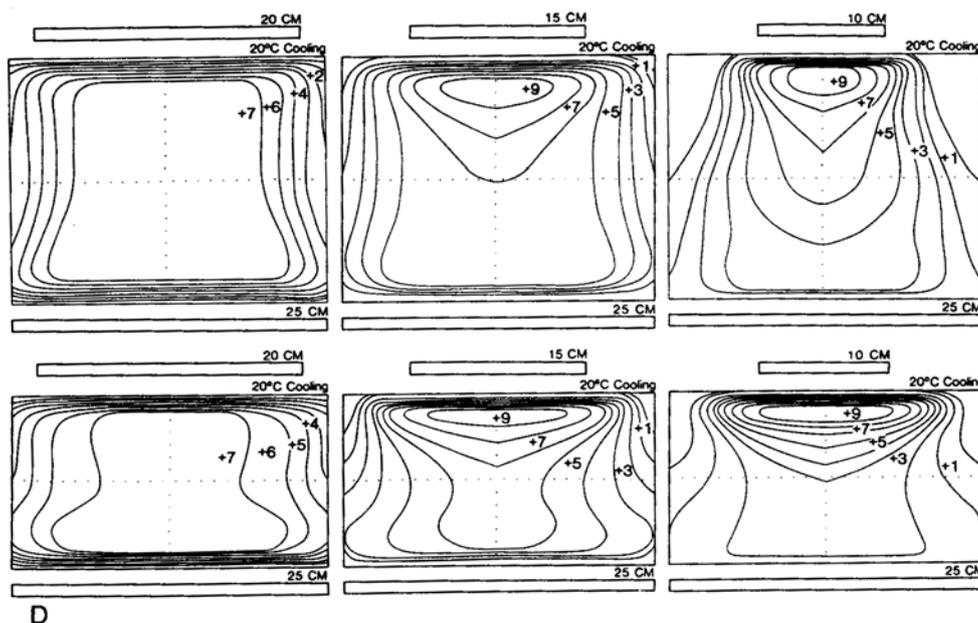


Fig. 2. Temperature distribution in phantom heated with the device Thermotron RF-8. The phantom thickness on the top row is 20 cm, on the bottom one 15 cm. The sizes of the applicators and the temperature levels, for different heating conditions, are given in the figures. The shaded areas under the applicators are hot zones

In other model experiments and on phantoms imitating the human body, for various hyperthermic systems, the distribution of SAR and temperatures in the pelvic organs and tumors was also studied [40, 41]. In the work of Frija E., Cavagnaro M. [40], the phantom was heterogeneous (skin, SCF, muscles) and had a cylindrical shape 85 cm high with the base in the form of an ellipse with semi-axes of 12 and 18 cm. The calculation was carried out for the capacitive system Celsius TCS and the radiative systems BSD-2000 and ALBA-4D, all with an output power of 500 W. SAR was calculated for the small pelvis, SCF, bladder and cervix. The conditions for calculating SAR were as follows: when the bladder was the target, the diameter of the ventral applicator was 15 cm and that of the dorsal applicator 25 cm, when the cervix was the target both applicators were 25 cm.

In fig. 3 and 4 show the distribution of SAR in phantoms with SCF thickness of 1 cm ventrally and 2 cm dorsally.

Calculations showed that the maximum SAR to se Celsius TCS in the bladder was 46.1 W/kg, and in the cervix 10.3 W/kg. The maximum SAR in the SCF under the 15 cm diameter applicator was 2038.9 W/kg, and under the 25 cm applicator it was 588.1 W/ g. Thus, the maximum value of SAR in the SCF is 44 times higher than in the bladder and 57 times than in the cervix. Such high energy levels will result in a burning sensation, and require a decrease of radiated power or, otherwise, significantly increases the risk of burns in the SCF, which significantly limits the use of this device for HT tumors of internal organs. For radiative systems this ratio was much lower:

0.5 and 1.1 for he BSD-2000 system and 1.0 and 2.7 for the ALBA-4D system, respectively, allowing a higher energy levels in the umors of these organs.

Beck M. et al. [41] studied the SAR distribution achieved with the Celsius TCS in homogeneous phantoms of 10 and 14 cm thickness. The applied power was 100 W and both electrodes had a diameter of 25 cm. The results showed a sharp decrease in UPM in depth, a decrease by 50 % took place already at a depth of about 3 cm, by 75 % – by 5 cm. Since there is a between the SAR and the temperature, a the same sharp decrease in the level of heating in the depth of the fabric.

It should be noted that in studies of Frija E., Cavagnaro M. [40] and Beck M. et al. [41] do not take into account the heat carryover by the bloodstream, which during moderate HT rises in patients with tumors and prevents the rise in temperature. In addition, in their work did not take into account the fact that the applicators on the Celsius TCS unit in clinical conditions does not completely adhere to the heated surface, which further increases the temperature gradient along the depth.

Kok H.P. et al. [42] performed calculations of the distribution of the EM field for the irradiation (70 MHz) and capacitive systems, in frequency similar to Celsius TCS (13.6 MHz), in heterogeneous phantoms, imitating human pelvis, without SCF or with its thickness of 1 and 2 cm. The SAR was calculated for conditional tumors located in the center of the phantom (cancer of the cervix and prostate gland) and eccentric (cancer of the bladder and rectum). In addition, the calculations were also carried out for modeled patients with cancer of the pelvic

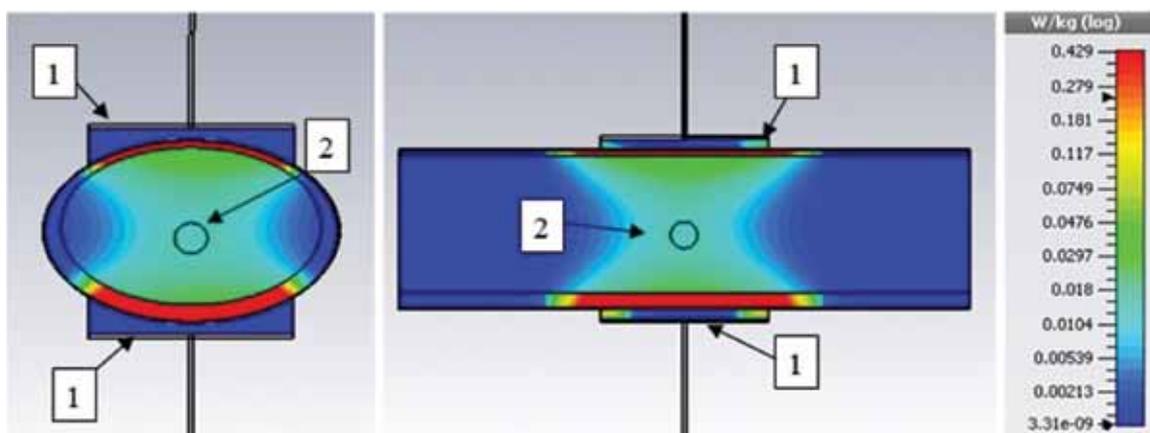


Fig. 3. Distribution of EM energy in the phantom simulating the pelvis with the uterine cervix, when heated with the Celsius TCS.
1 – applicators, 2 – cervix

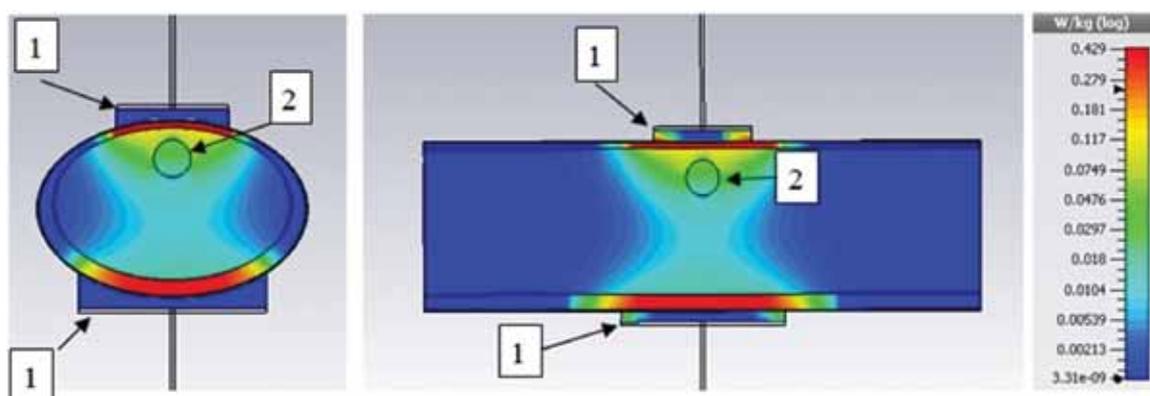


Fig. 4. Distribution of EM energy in the phantom simulating the pelvis with the bladder, when heated with the Celsius TCS.
1 – applicators, 2 – bladder

organs, with various types of bolus filling and skin cooling. The authors showed that with capacitive heating, any fat layer reduces the energy transmitted in depth.

Only the lack of fat in patients allows to reach temperatures above 40 °C in the selected target located. Calculations on patient models showed that the T90 (the temperature level reached in at least 90 % of the target) is approximately 37.3 °C in cervical and prostate cancer, 38–38.3 °C in bladder, and 37.5–38 °C in rectal cancer.

Results of experimental and clinical research on capacitive hyperthermic systems

HTM3000P (13.56 MHz) system. Testing of this system was conducted in Dutch in 11 patients with recurrent rectal and sigmoid carcinoma. From 496 measurements of the temperature in the tumor in 288 (58 %), it was below 40 °C. The mean thickness of the SCF in the anterior abdominal wall was 1.5 ± 0.3 cm (1–2.7 cm), in the dorsal region it was 2.1 ± 0.7 cm (1.2–3.1 cm). The skin was pre-cooled with water circulating in the bolus at 5–10 °C for 30 min. RFHT was carried out

using large electrodes (300 cm²) in various set-ups at an average output power of 700 W (maximum power of the unit was 1400 W). Heating with a higher output power was limited due to patients' complaints of burning sensations and pain under the applicators due to overheating of the SCF. The temperature at the border of the SCF-muscle was above 44 °C [33].

Superterm EP-40 (40.68 MHz), **Extraterm** (40.68 MHz). Clinical studies on these installations have also shown that, with the thickness of SCF more than 1,5–2,0 cm, it is practically impossible to reach therapeutic temperatures in tumors of internal organs. With a smaller thickness of SCF, it is possible in malignant neoplasms of the lung, liver and rectum, as well as soft tissue sarcomas and osteogenic sarcomas with deep localization [43].

Cancermia GHT-RF8 (8 MHz). Experimental and clinical studies on this setup are rare [44, 45]. Seong J. et al. [44] LRHT performed 84 patients with unresectable primary liver cancer on this unit. HT with a duration of 30–60 min was carried out for 30 min after the remote RT (TD 30.6 Gy / 3.5 weeks). The maximum, minimum and

average temperatures in the tumor were 41.9 ± 1.3 °C, 39.9 ± 1.0 °C and 40.8 ± 0.9 °C, respectively. During treatment, 51.2 % of patients felt pain in the area of heating and as a result, 13.1 % developed SCF necrosis. The results of the treatment, evaluated in 67 patients, showed that in 27 (40 %) tumors regressed by more than 50 %, including 2 with a full response. Symptomatic improvement was observed in 78.6 % of patients. Acute toxicity in the form of pain was observed in 51.2 % of patients, and necrosis of the SCF in 13.1 %. The actuarial 1, 2 and 3-year survival rates were 44.8 %, 19.7 %, 15.6 %, respectively. The median survival was 6 months. Kim S-W. et al. [45] compared the effectiveness of neoadjuvant CRT and thermochemoradiotherapy (TCRT) in patients with locally advanced rectal cancer. In the group of patients with TCRT, compared with CRT, there was a tendency to a decrease in the stage of the disease ($p = 0.060$) and an increase in the frequency of the pathological complete tumor response ($p = 0.064$). Overall survival was significantly higher ($p = 0.014$) in the study group.

Oncothermia (13.56 MHz). Lee S-Y. et al. [46] report temperatures during treatment of 20 patients with cervical cancer (FIGO stage IIb–IVb). Patients were treated during 60 min, with a 30 cm diameter electrode at power levels of 80 W for 10 min, 120 W for 10 min and 150 W for 40 min. The temperature in the lumen of the cervix had increased from 36.7 ± 0.2 to 37.5 ± 0.5 °C after 30 min from start of treatment, and to 38.5 ± 0.8 °C at the end of the session.

One of the authors (Kurpeshev O.K.) has observed a treatment with the Oncotherm device in one of the oncological centers of Russia, in a patient with cervical cancer [8]. The patient was frail physique with a height of 164 cm and weight of 50 kg. The anterior-posterior diameter in the pelvic region was 13 cm, and the thickness of the SCF in the anterior abdominal wall was 0.9 cm. Thermometry was performed using an alcohol thermometer and fiber optic sensors. The pelvic region was treated by using an active electrode of 30 cm in diameter. The exposure was started with 60 W, and power was stepwise increased to 110 W within the next 60 min and continued with the same power level until the end of treatment of total 90 min. A further increase in power was impossible, because of a strong burning sensation in the skin under the active electrode. At the end of the session, the temperature in the rectum was 37.2 °C, in the vagina 37.1 °C, and in the urethra 36.9 °C.

The data suggests that on the Onkoterm facility, in tumors of deep localization, it is not possible to create a hyperthermic regime in a classical sense. Moreover, the developers of the method themselves, in the description of this technology approved by the ministry of Health of Russia [47] also point out the absence of a hyperthermic regime in the tumor. On page 5, they write: "... in the theory of oncothermia (this is the name of the treatment

named after the device – authors' notes), the static / hyperthermic phase is perceived as undesirable". But, further they write: "... the temperature during oncothermia is responsible for less than a quarter of the total efficiency of the method, while the rest $\frac{3}{4}$ provide non-thermal factors (field, electrodynamic)". We can agree with the authors' statements about the minimal contribution of HT to the therapeutic effect; moreover, we believe that at such temperatures that are achieved at this facility in tumors of the internal organs, it can be completely absent.

Celsius TCS. During the existence of this facility on the market of medical devices (over 12 years), full-fledged thermometric studies in the clinic have not been carried out. The failure of achieving therapeutic temperatures in a patient with rectal cancer treated with this device was observed by one of the authors (Kurpeshev O.K.) in one of the oncological clinics in Russia [8]. The anterior-posterior size of the patient in the pelvic region was 13.5 cm, the thickness of the SCF in this region was maximum 1.2 cm. RFHT was applied to the pelvic region, during 60 min with a pair of electrodes of diameter of 25 cm each. The temperature was monitored intrarectally using an alcohol thermometer with a 0.5 cm reservoir in close contact to the tumor. The heating was started with an output power of 50–60 W and for 40 min it was brought up to 130 W, for 50 min – up to 150 W. A further increase in power was not possible due to the appearance of a strong burning sensation on the skin under the applicators. Peritumoral temperature on the 40th minute of heating was 38 °C, and at the end of the session (60 min) – 38.5 °C.

Experiments on pigs also have shown the problem of heating at depth with this device Noh J.M. et al. [48]. Pigs weighing 40 kg were treated under general anesthesia. During one day the animals were exposed to 6 treatment sessions of 60 min, at intervals of 30 min. Despite the decrease in blood flow in the liver and thereby decrease in heat removal, due to general anesthesia, the maximum temperature increase of 2.7 °C took place only at the end of the sixth session when the power input had increased to 200 W. Thus, even in this experiment on a low-weighted and anesthetized pig, it was not possible to obtain therapeutic temperature.

In the absence of clinical research, the developers of Celsius TCS recommend using specific schemes of power increase for clinical applications. The treatment involves 10 sessions of HT for 60 min, with a gradual increase in the radiation power during the procedure. In particular, in the treatment of patients with liver tumors in the 1st session, treatment begins with 40 W and ends at 100 W. In each subsequent session, the output power is increased by 10–20 W. At the 10th session, treatment begins with 100 W and for 50 min increases to 170 W, then for 10 min, if the patient's condition allows, it is allowed to rise to

the maximum tolerated power. But, as practice shows, an output of 200 W with HT tumors of internal organs in this unit is very problematic.

Such a scheme of power increase for the Celsius TCS device was applied by Yu J.I. et al. [49], in combination with radiation therapy, in patients with metastases (MTS) of colorectal cancer in the liver. As can be seen in table, they started with 40 W at the beginning of the first session and increased power during 60 min to 100 Watts. In the subsequent 4 sessions, the starting power was increased from 50 to 85 W, and the maximum power from 120 to 200 W. Five sessions of HT and seven fractions (3 Gy each) of total liver irradiation were applied. Unfortunately, the authors did not measure the temperature in MTS. Taking into account the general laws of distribution of EM energy at this facility [40, 41] and the results of research on other such systems, it can be assumed that in MTS, at the EMF facilities used, the hyperthermic regime was not achieved. Perhaps for this reason, the contribution of HT to the effectiveness of RT was not obtained. The treatment results in ten patients were as followed. Within 1 month, a partial response was achieved in 3 (30 %) patients, stabilization in 4 (40 %), and pain reduction in 4 (40 %). At 3 months, local progression free survival was 30 % (median 2.2 months) and pain progression free survival was 58.3 %. At that time, 1 patient had died from progression of MTS in the pleura, and 3 patients had developed grade III toxicity. Comparison of the obtained results with previous studies of MTS of colorectal cancer in the liver, including Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) studies, did not show clear differences in effects on pain [50–52]. In the RTOG study, pain decrease 1 month after treatment was observed in 50 % of patients, which was higher than in the group treated with thermoradiation (TRT). The liver function and general condition of patients tended to worsen after TRT, whereas in the RTOG study these improved in 40 % and 49 %, respectively. That is why, Yu J.I. et al. [49] conclude that they could not demonstrate an improvement in results of the treatment with the Celsius device.

Thus, experimental studies on phantoms, animals, as well as a single temperature measurement in a patient

show that it is impossible to create a hyperthermic regime in tumors of deep localization using the Celsius device. As already mentioned, the table data offered for work in the clinic (used and in the experiment) provide for an increase in power from 60–90 to 160–190 W during the 40–50 min of treatment, and for the remaining 10 min allowed to increase it to the maximum portable.

However, due to the peculiarities of the applicator design, the output of 200 W in the clinical environment is very problematic. Comparative analysis with literature data shows that the RF field used at the Celsius TCS turned out to be significantly lower than at devices of this type carried out by other researchers [33, 45, 53–55]. In these studies, it was shown that with using capacitive RFHT at frequencies of 8 and 13.56 MHz, the minimum RF field required to achieve the minimum hyperthermic regime in tumors of internal organs varies from 500–800 W, the maximum – 1000–1200 watts and above. In particular, according to Van Rhoon G.C. et al. [33] on the HTM3000P device (13.56 MHz) with an average thickness of the SCF of the anterior abdominal wall 1.5 ± 0.3 cm (1–2.7 cm), the sacrum area 2.1 ± 0.7 cm (1.2–3.1 cm) and the use of electrodes with an area of 300 cm², the average power used was 700 W, the maximum – 1400 W.

Kim S-W. et al. [45] for TCRT patients with locally advanced colorectal cancer, the Cancermia GHT-RF8 (8 MHz) machine used an average output power of an average of 800 ± 229 W, and a maximum of 1005 ± 232 W.

In studies of Harima Y. et al. [54–55] used output power at Thermotron ranged from 800 to 1500 W. The reason for the impossibility of increasing the power of EMF to these values is the appearance of a burning sensation on the skin and pain under the applicators, which indicates a wrong approach to treatment and selection of patients or non-compliance of the design of applicators with the technical requirements.

On the basis of the available experimental clinical data and the results of model calculations and measurements on phantoms [8, 40, 41, 48, 49], we believe that the data of some publications that are not fully justified say that in tumors of the internal organs of patients (lung cancer, cervix, rectum), on the installation Celsius TCS reaches a

Table

The calculated settings used by Yu J.I. et al. [49] in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer in the liver*

Session №№	Radiated power (W) for different levels (L) irradiation during the session					The total dose (kJ) (60 min)
	L1	L2	L3	L4	L5	
1	40	60	70	90	100	240
2	50	70	85	100	120	285
3	60	80	100	120	150	342
4	75	100	130	160	180	432
5	85	110	135	160	200	465

* – for clarity, the table is fully photographed from the article

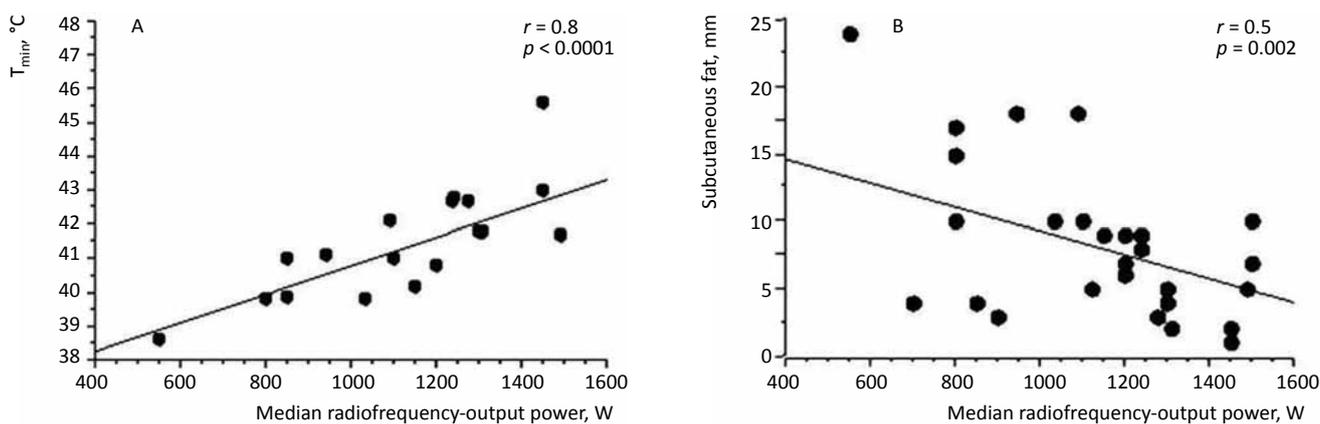


Fig. 5. Correlation between output power and minimum temperature in the esophagus (A), as well as the thickness of the SCF (B)

temperature of 41–45 °C [56, 57]. In this regard, the high results of HT obtained in this setting in patients with these tumor sites require careful analysis and discussion..

Thermotron RF-8. At this device, the largest number of experimental and clinical studies on HT. Several of these studies have shown a direct relationship between the temperature in deep seated tumors, the EM power applied, and the thickness of the SCF [6, 26, 32, 37–39, 53–55, 58–70]. In this setting, 7 randomized studies were performed on patients with malignant neoplasms of internal organs. Five of them showed a high contribution of HT to the antitumor treatment, 2 it was absent due to underheating of the tumor and / or a small sample [8].

In an multi-institutional study, Abe et al. [26] showed that the temperature and also the immediate response of the tumor, depended on the depth of the tumor. In the total group of 63 patients, the average temperature was 42.5 ± 0.5 °C. In superficial tumors (depth up to 3 cm), the complete response rate was 68 %, for tumors at a depth of 3–6 cm it was 54 %, and for tumors located at more than 6 cm depth it was 23 %. In seven of 20 (35 %) tumors located at >6 cm depth, a temperature of more than 42 °C was not achieved. In these patients, the SCF thickness was more than 2 cm.

Ohguri T. et al. [53], in 35 patients with non-small-cell lung cancer stage III, statistically significant correlations were established between the esophageal temperature, the output power, the thickness of the SCF, and the results of treatment. Heating was performed using electrodes with diameters of 30 cm, and with an output power ranging from 548 to 1560 W. Thermometry in the esophagus was performed in 22 patients. The temperature varied from 39 to 48 °C and depended on the size of the thorax and the thickness of the SCF. A significant increase in overall survival ($p = 0.01$), local control ($p = 0.004$), and distant metastasis free survival ($p = 0.02$) was observed when the median applied power was minimum 1200 W.

With such high power, the minimum temperature in the esophagus was > 41.5 °C (fig. 5A). These high temperatures were achieved in patients with a mean SCF thickness of 0.75 cm. (fig. 5B). In these works, the median intra-esophageal minimum (41.7 °C) and maximum temperature (43.2 °C) highly correlated with the corresponding medians of the output power, which were 548 and 1679 W, respectively.

According to Harima Y. et al. [54] in a multicenter randomized clinical trial in patients with cervical cancer with IIIB st. HT significantly increased the results of CRT. In these cases, the average temperature of 40.6 °C in the tumor was achieved with an output power of 800–1500 W. However, with the expansion of patients to IIA–IVA st. no significant contribution of HT to efficacy of CRT was obtained, although 5-year survival rates (total, disease-free, recurrence-free) were 9–13 % higher compared to control [55]. The output power from 800 to 1500 W was used in the work. At these capacities, the maximum temperature in the rectum and vagina ranged from 40.1 to 44.6 °C (average 42.2 °C), the average – from 39.6 to 42.5 °C (average 41.1 °C), CEM43T90 – from 0.1 to 46.6 min (average 3.8 min).

Hiraoka M. et al. [58, 59] studied the relationship between SCF thickness and maximum temperature in tumors with a localization at a depth of more than 5 cm (head and neck region, thorax, abdominal region, pelvic organs, lower limbs). The skin was cooled with the bolus water at 5–10 °C. The dimension of the water bolus for cooling exceeded the size of the electrode by at least 6 cm. In 38 % of tumors they achieved a temperature above 43°C, in 44 % between 41 and 43 °C, and in the remaining 18 % it was below 41 °C. The objective response rates for these various temperature groups were 53, 82 and 33 %, respectively. During treatment, 27 (68 %) of 40 patients experienced pain, which had disappeared after completion of HT in 20 patients. However, four (10 %) patients

developed SCF necrosis, two (5 %) had a 2nd degree skin burn, and four (10 %) had visible edema in the treated area. When the SCF thickness was 0,5 cm, a maximum tumor temperature of over 41 °C was achieved in 86 % of cases (6/7), for 0.5–1.0 cm in 89 % (16/18), for 1.0–1.5 cm in 95 % (18/19), for 1.5–2.0 cm in 60 % (6/10), and for more than 2.0 cm in only 17 % (1/6). The authors conclude that for capacitive RFHT, the thickness of the SCF should not exceed 1.5 cm.

A randomized, multicentric study on the effect of HT in cervical cancer showed that in only 2 of 4 cancer centers, tumors reached temperatures above 41 °C. In the two other centers this was from 40.2 to 40.6 °C, and from 37.5 to 39 °C [60]. It should be noted that patients with a SCF thickness of up to 3 cm were included in this study, and that at least half of the patients were treated with an additional intravaginal electrode with the temperature measured in contact with this electrode, where it can be expected to be the highest. Even greater temperature variations were noted in a study by Konishi et al. [61] in patients with rectal cancer ($n = 17$). The intratumor temperature varied from 38 to 44 °C, with an average of 41 °C. Low temperatures were also associated with thicker SCF layers.

Similar results were obtained in patients with liver and pancreatic cancer [26, 62–64]. Yoshida M. et al. [62] with capacitive RFHT, 24 patients with pancreatic cancer in 15 (62.5 %) reached a temperature in the tumor above 42 °C. Nagata T. et al. [63, 64] also showed the dependence of achieved tumor temperature on the tumor type and SCF thickness. In hepatocellular carcinoma, the maximum temperature reached 41.2 ± 0.2 °C, the average temperature was 40.3 ± 0.3 °C, and the minimum temperature was 40.1 ± 0.2 °C. For a massive tumor these values were 41.1 ± 0.2 °C and 40.0 ± 0.2 °C respectively, for a nodal type 41.0 ± 0.3 °C and 40.0 ± 0.4 °C, for diffuse tumors 42.1 ± 0.6 °C and 40.6 ± 0.5 °C. For metastases MTS the maximum temperature was 42.4 ± 0.2 °C, the average temperature 41.8 ± 0.2 °C, and the minimum 40.7 ± 0.2 °C. The maximum temperature in the liver parenchyma averaged 39.6 ± 0.2 °C (38.2–41.4 °C), and in the SCF – 40.3 ± 0.3 °C (38.7–41.4 °C). The thickness of the SCF ranged from 0.3 to 1.2 cm (with an average of 0.8 cm). The immediate response of tumors were associated rather with the maximum than with the minimum temperature. Necrosis of SCF developed in 20 (12 %) patients, gastric ulceration in four (2 %), and liver necrosis in one (1 %). Consequences of thermometry were severe peritoneal pain in seven (11 %) patients, intraperitoneal hematoma in one (1 %) and pneumothorax in one (1 %).

In a modelled patient with hepatocellular cancer, the calculated average tumor temperature during 50 min heating with the Thermotron device was 39.7 °C. In the

real treated patient the average measured temperature was 40.3 °C, that is, it differed not much [39].

Hamazoe R. et al. [65] analyzed 318 hyperthermia treatments of 39 patients with recurrent or inoperable malignant tumors of the digestive system. Although it was difficult to heat the bile duct and pancreatic tumors to 42 °C, they observed a high correlation between the maximum output power of EM energy and the maximum temperature in the tumor ($p < 0.001$). Moreover, a correlation was found between tumor response and applied RF power. A high response rate was observed with an average output power of 1000 W, a minimum of 700 W, after four or more HT sessions. The authors conclude that the level of maximum applied power can be a good indicator of the effectiveness of the treatment for abdominal tumors.

Further studies have shown that with the Thermotron device, heating of deep seated tumors to temperatures of 40 °C and higher is possible when the SCF thickness is less than 1.5 cm [66–70].

Discussion

The main problem of the classical capacitive EMHT of malignant neoplasms of deep localization is overheating of the SCF, up to the development of burns. Thermal load on it can be reduced by intensive cooling of the skin. The resulting high temperature can be decreased by extensive cooling of the skin with the SCF less than 1.5–2 cm thick. This means that the capacitive system is not always applicable in patients with tumors of deep localization. Another disadvantage of capacitive heating is the limited ability to control power to bring maximum energy to the tumor. This is achieved only by selecting the size and location of the electrodes above the tumor. To improve the depth of heating, when using these systems, it is necessary to comply with a number of technical requirements and conditions of the HT. First of all, it concerns the characteristics of the membranes of applicators and additional water boluses. They must be elastic and thin – no more than 0.7–0.8 mm. This contributes to a better fit of the membranes to the body of the patient, that is, without the formation of air gaps between them and the body of the patient. To reduce the edge effect, the size of the bolus should be larger than the size of the electrodes, that is, cover the heating area. In a capacitive RFHT at frequencies of 8–13.56 MHz, obtaining the minimum hyperthermic mode is possible with output powers of 500–800 W, maximum – at 1000–1200 W and above.

Conclusion

The results of both experimental and clinical studies show that with the help of some capacitive systems presented in this review, it is impossible to create

hyperthermic regimens in tumors of deep localization. Such installations can be used for HT superficial, in some cases, subsurface tumors. Finally, temperature measurement with HT is the fundamental basis for applying this type of treatment.

REFERENCES

- Berdov BA, Kurpeshev OK, Mardynsky YuS. Influence of hyperthermia and hyperglycemia on the efficacy of radiotherapy for cancer patients. *Russian Oncol J.* 1996;(1):12-6. (Russian).
- Pankratov VA, Andreev VG, Rozhnov VA, et al. Simultaneous use of chemo- and radiotherapy with independent conservative and combined treatment of patients with locally advanced cancer of the larynx and the laryngopharynx. *Siberian Oncol J.* 2007;(1):18-22. (Russian).
- Van der Zee J, Vujaskovic Z, Kondo M, Sugahara T. Part I. Clinical Hyperthermia. The Kadota Fund International Forum 2004 - Clinical group consensus. *Int J Hyperterm.* 2008;24(2):111-22.
- Westermann A, Mella O, Van der Zee J, et al. Long-term survival data of triple modality treatment of stage IIB-III-IVA cervical cancer with the combination of radiotherapy, chemotherapy and hyperthermia – an update. *Int J Hyperterm.* 2012;28(6):549-53. DOI: 10.3109/02656736.2012.673047.
- Kurpeshev OK, Mardinsky YuS, Maksimov SA. Combined treatment of patients with oral cancer using the “conditionally-dynamic” mode of fractionation of radiation therapy and locoregional hyperthermia. *Siberian Medical Review.* 2011;67(1):80-4. (Russian).
- Ohguri T. Current Status of Clinical Evidence for Electromagnetic Hyperthermia on Prospective Trials. *Thermal Med.* 2015;31(2):5-12.
- Van der Zee J, Van Rhoon GC. Hyperthermia with radiotherapy and with systemic therapies. In.: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management* (Eds: U. Veronesi A. Goldhirsch P. Veronesi OD. Gentilini MCL). Springer Int. Publ. 2017:855-62. DOI: 10.1007/978-3-319-48848-6_75.
- Kurpeshev OK, van der Zee J. Analysis of results of randomized studies on hyperthermia in Oncology. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2018; 63(2):52-67. (Russian). DOI: 10.12737/article_5b179d60437d54.24079640.
- Konoplyannikov AG, Dedenkov AN, Kurpeshev OK, et al. Local hyperthermia in radiation therapy of malignant neoplasms. Scientific review. Ed. A.F. Tsyb. Series overview information in medicine and health. Moscow: The Medicine. Oncology. 1983. 72 p. (Russian).
- Kurpeshev OK. Patterns of radiosensitizing and damaging effects of hyperthermia on normal and tumor tissues (experimental clinical study): – Author’s abstract. diss. PhD Med. Obninsk, 1989. 35 p. (Russian).
- Kurpeshev OK. Possibilities and prospects for the use of hyperthermia in medicine. *Clinical Medicine.* 1996. (1):14-6. (Russian).
- Pankratov VA, Andreev VG, Kurpeshev OK, et al. Application of thermochemical treatment in patients with locally advanced cancer of the larynx and hypopharynx. *Russian Oncol J.* 2006;(4):20-3. (Russian).
- Wainson AA, Mescherikova VV, Lavrova Yu E, Mazokhin VN. The efficacy of simultaneous and sequential irradiation and hyperthermic treatment of tumor cells *in vitro* and transplantable tumors *in vivo*. *Radiat Biol Radioecol.* 2012;52(5):510-6. (Russian).
- Wainson AA, Mescherikova VV, Tkachev SI. Radiothermomodifying effect of Cisplatin, Gemzar and Paclitaxel on tumor cells *in vitro*. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2016; 61(2):25-9. Russian
- Kurpeshev OK, Tsyb AF, Mardynsky YuS, Berdov BA. Mechanisms of development and ways of overcoming chemoresistance of tumors. Part 3. Possible ways to overcome the chemoresistance of tumors. *Russian Oncol J.* 2003;(2):50-2. (Russian).
- Toraya-Brown S, Sheen MR, Zhang P, et al. Local hyperthermia treatment of tumors induces CD8⁺ T cell-mediated resistance against distal and secondary tumors. *Nanomedicine.* 2014;10(6):1273-85. DOI: 10.1016/j.nano.2014.01.011.
- Van der Heijden AG, Dewhurst MW. Effects of hyperthermia in neutralizing mechanisms of drug resistance in non-muscleinvasive bladder cancer. *Int J Hyperterm.* 2016;32(4):434-45. DOI: 10.3109/02656736.2016.1155761
- Franckena M, Fatehi D, de Bruijne M, et al. Hyperthermia dose-effect relationship in 420 patients with cervical cancer treated with combined radiotherapy and hyperthermia. *Eur J Cancer.* 2009; 45:1969-78. DOI: 10.1016/j.ejca.2009.03.009.
- Dewhurst MW, Sim DA, Sapareto S, Connor WG. Importance of minimum tumor temperature in determining early and long-term responses of spontaneous canine and feline tumors to heat and radiation. *Cancer Res.* 1984;44(1):43-50.
- Sherar M, Liu FF, Pintilie M, et al. Relationship between thermal dose and outcome in thermoradiotherapy treatments for superficial recurrences of breast cancer: data from a phase III trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997;39(2):371-80.
- Jones EL, Oleson JR, Prosnitz LR, et al. Randomized trial of hyperthermia and radiation for superficial tumors. *J Clin Oncol.* 2005; 23:3079-85.
- Hand JW, Machin D, Vernon CC, Whaley JB. Analysis of thermal parameters obtained during phase III trials of hyperthermia as an adjunct to radiotherapy in the treatment of breast carcinoma. *Int J Hyperterm.* 1997;13(4):343-64.
- Xia T, Sun Q, Shi X, et al. Relationship between thermal parameters and tumor response in hyperthermia combined with radiation therapy. *Int J Clin Oncol.* 2001; 6(3):138-42.
- Canter RAM, Wust P, Bakker JF, Van Rhoon G. A literature survey on indicators for characterization and optimization of SAR distributions in deep hyperthermia, a plea for standardization. *Int J Hyperterm.* 2009;25:593-608.
- Bruggmoser G, Bauchowitz S, Canter R, et al. Guideline for the clinical application, documentation and analysis of clinical studies for regional deep hyperthermia. *Strahlenther Onkol.* 2012;188(Suppl. 2):198-211. DOI: 10.1007/s00066-012-0176-2.
- Abe M, Hiraoka M, Takahashi M.I, et al. Multi-Institutional Studies on Hyperthermia Using an 8-MHz Radiofrequency Capacitive Heating Device (Thermotron RF-8) in Combination With Radiation for Cancer Therapy. *Cancer* 1986;58(8):1589-95.
- Sidi J, Jasmin C, Convert G, et al. Shortwave regional hyperthermia of the pelvis. *Biomed Thermol.* 1982;107:739-44.
- Van Rhoon GC, Sowinski MJ, Van Den Berg et al. A ring capacitor applicator in hyperthermia: energy distributions in a fat-muscle layered model for different ring electrode configurations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990;18:77-85.
- Kim KS, Hernandez D, Lee SY. Time-multiplexed two-channel capacitive radiofrequency hyperthermia with nanoparticle mediation. *BioMed Eng OnLine.* 2015;14:95. DOI: 10.1186/s12938-015-0090-9.
- Brezovich I. A. Heating of subcutaneous fat in localized current field hyperthermia with external electrodes. *Med Phys.* 1979;6(4):352-8.

31. Brezovich I.A, Lilly M.B, Durant J.R, et al. A practical system for clinical hyperthermia radiofrequency. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1981;7(3):423-30.
32. Yanagawa S, Sone Y, Doi H, Yamamoto G. A new procedure for the prevention of surface overheating in deep hyperthermia using RF capacitive heating equipment. *Jpn J Hyperterm Oncol.* 1985;1:187-91.
33. Van Rhoon GC, Van der Zee J, Broekmeyer-Reurink MP, et al. Radiofrequency capacitive heating of deep-seated tumours using pre-cooling of the subcutaneous tissues: results on thermometry in Dutch patients. *Int J Hyperterm.* 1992; 8:843-54.
34. Kato H, Hiraoka M, Nakajima T, Ishida T. Deep heating characteristics of an RF capacitive heating device. *Int J Hyperterm.* 1985;1:15-28.
35. Rhee JG, Lee CKK, Osborn J, et al. Precooling prevents overheating of subcutaneous fat in the use of RF capacitive heating. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991;20(5):1009-15. DOI: 10.1016/0360-3016(91)90198-D.
36. Kumagae K, Saito K. Air Gap Filler Material for Hot Spot Reduction in the Capacitive Heating Device. *Thermal Med.* 2016;32(2):5-11.
37. Tanaka H, Kato H, Nishida T, et al. Physical basis of RF hyperthermia for cancer therapy (2). Measurement of distribution of absorbed power from radiofrequency exposure in agar phantom. *J Radiat Res.* 1981;22:101-8.
38. Lee CKK, Song CW, Rhee JG, Levitt SH. Clinical Experience with Thermotron RF-8 Capacitive Heating for Bulky Tumors: University of Minnesota Experience. *Radiol Clin of North America.* 1989;27(3):543-58.
39. Chen C-C, Kiang J-F. Efficacy of Magnetic and Capacitive Hyperthermia on Hepatocellular Carcinoma. *Progress Electromagn Res.* 2018;64:181-92.
40. Frija E, Cavagnaro M. A comparison between radiative and capacitive systems in deep hyperthermia treatments. 31st An Meet of the Eur Soc for Hyperterm Oncol. Greece, Athens, 21-23 June 2017:62-3. OP-07.
41. Beck M, Chrozon B, Lim A, et al. SAR profiles generated with a capacitive hyperthermia system in a porcine phantom. *Strahlenther Onkol.* 2018;194:493-4.
42. Kok HP, Navarro F, Strigari L, et al. Locoregional hyperthermia of deep-seated tumors applied with capacitive and radiative systems: a simulation study. *Int J Hyperterm.* 2018. DOI: 10.1080/02656736.2018.1448119
43. Lopatin VF. Method of local UHF hyperthermia. *Med Fizika.* 2011;(4):85-95. (Russian).
44. Seong J, Lee HS, Han KH, et al. Combined treatment of radiotherapy and hyperthermia for unresectable hepatocellular carcinoma. *Yonsei Medical J.* 1994;35(3):252-9.
45. Kim SW, Yea JW, Kim JH, et al. Selecting patients for hyperthermia combined with preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2018;23(2):287-97. DOI: 10.1007/s10147-017-1213-z.
46. Lee S-Y, Kim J-H, Han Y-H, Cho D-H. The effect of modulated electro-hyperthermia on temperature and blood flow in human cervical carcinoma. *Int J Hyperterm.* 2018. DOI: 10.1080/02656736.2018.1423709
47. Rusakov SV, Sas A, Sas O, Sas N. A method for the treatment of solid malignant tumors by the method of Oncothermia (medical technology). Moscow. 2011:96 p. (Russian).
48. Noh JM, Kim HY, Park HC, et al. *In vivo* verification of regional hyperthermia in the liver. *Radiat Oncol J.* 2014;32(4):256-61.
49. Yu JI, Park HC, Choi DH. Prospective phase II trial of regional hyperthermia and whole liver irradiation for numerous chemorefractory liver metastases from colorectal cancer. *Radiat Oncol J.* 2016;34(1):34-44. DOI: 10.3857/roj.2016.34.1.34.
50. Park JS, Park HC, Choi DH, et al. Prognostic and predictive value of liver volume in colorectal cancer patients with unresectable liver metastases. *Radiat Oncol J.* 2014;32(2):77-83.
51. Yeo SG, Kim DY, Kim TH, et al. Whole-liver radiotherapy for end-stage colorectal cancer patients with massive liver metastases and advanced hepatic dysfunction. *Radiat Oncol.* 2010;5:97.
52. Borgelt BB, Gelber R, Brady LW, Griffin T, Hendrickson FR. The palliation of hepatic metastases: results of the Radiation Therapy Oncology Group pilot study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1981;7(5):587-91.
53. Ohguri T, Imada H, Yahara K, et al. Radiotherapy with 8-MHz radiofrequency-capacitive regional hyperthermia for stage III non-small-cell lung cancer: the radiofrequency-output power correlates with the intraesophageal temperature and clinical outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;73(1):128-35. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2008.03.059.
54. Harima Y, Nagata K, Harima K, et al. A randomized clinical trial of radiation therapy versus thermoradiotherapy in stage IIIB cervical carcinoma. *Int J Hyperterm.* 2001;17(2):97-105. DOI: 10.1080/02656730010001333.
55. Harima Y, Ohguri T, Imada H, et al. A multicentre randomised clinical trial of chemoradiotherapy plus hyperthermia versus chemoradiotherapy alone in patients with locally advanced cervical cancer. *Int J Hyperterm.* 2016;32(7):801-8.
56. Gordeev SS. Master class on the use of local hyperthermia in patients with rectal cancer in Krasnodar. *Onkol Coloproctology J.* 2013; 3(2):9-10. (Russian).
57. Startseva JA, Choyznzonov ET. Local hyperthermia in the combined treatment of patients with malignant neoplasms. *Russian Cancer J.* 2015;(4):47-8. (Russian). <http://www.studmedlib.ru/ru/doc/1028-99844-SCN0030.html>
58. Hiraoka M, Jo S, Akuta K. Radiofrequency capacitive hyperthermia for deep-seated tumors. I. Studies on thermometry. *Cancer.* 1987; (60):121-7.
59. Hiraoka M, Jo S, Akuta K, et al. Radiofrequency capacitive hyperthermia for deep-seated tumors II. Effects of thermoradiotherapy. *Cancer.* 1987;60:128-35.
60. Vasanthan A, Mitsumori M, Park JH, et al. Regional hyperthermia combined with radiotherapy for uterine cervical cancers: a multi-institutional prospective randomized trial of the international atomic energy agency. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;61(1):145-53.
61. Konishi F, Furuta K, Kanazawa K, et al. The effect of hyperthermia in the preoperative combined treatment of radiation, hyperthermia and chemotherapy for rectal carcinoma. *Jpn J Gastroenterol Surg.* 1994;(27):789-96.
62. Yoshida M, Shioura H, Tomi M, et al. Multimodal combination therapy including hyperthermia for inoperable pancreatic cancer. *Proc 7th Int Cong Hyperterm Oncol.* Rome. 1996;2:38-9.
63. Nagata Y, Hiraoka M, Akuta K, et al. Radiofrequency thermotherapy for malignant liver tumors. *Cancer.* 1990; 65(8):1730-6.
64. Nagata Y, Hiraoka M, Nishimura Y, et al. Clinical results of radiofrequency hyperthermia for malignant liver tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997;38(2):359-5.
65. Hamazoe R, Maeta M, Murakami A, et al. Heating efficiency of radiofrequency capacitive hyperthermia for treatment of deep-seated tumors in the peritoneal cavity. *J Surg Oncol.* 1991;48:176-9.
66. Nakajima K, Hisazumi H, Yamamoto H, et al. A study of regional temperature rise in bladder cancer patients during RF-hyperthermia. *Jpn J Hyperterm Oncol.* 1986(2):43-8.

67. Nakajima K, Hisazumi H. Studies of temperature rise in subcutaneous fat tissue during RF-hyperthermia. *Jpn J Hyperterm Oncol.* 1987;(3):87-91.
68. Kubota Y, Sakai N, Watai K, et al. Hyperthermia by regional capacitive heating. In: *Hyperthermic oncology.* 1988, Vol. 2. Sugahara T, Saito M. (Eds.). Taylor & Francis, London, 1989, 605-8.
69. Masunaga S-I, Hiraoka M, Akuta K. Non-randomized trials of thermoradiotherapy versus radiotherapy for preoperative treatment of invasive urinary bladder cancer. *J Jpn Soc Ther Radiol Oncol.* 1990;2:313-20.
70. Lee CK, Song CW, Rhee JG, et al. Clinical experience using 8 MHz radiofrequency capacitive hyperthermia in combination with radiotherapy: results of a phase I/II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995;32(3):733-45. DOI: 10.1016/0360-3016(94)00608-N.
- For citation:** Kurpeshev OK, Van der Zee J, Cavagnaro M. Hyperthermia for Deep Seated Tumours – Possibilities of Heating with Capacitive Devices. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2019;64(4): 64-75. (English). DOI: 10.12737/1024-6177-2019-64-4-64-75

DOI: 10.12737/1024-6177-2019-64-4-64-75

О.К. Курпешев¹, Я. ван дер Зее², М. Кавагнaro³**ГИПЕРТЕРМИЯ ОПУХОЛЕЙ ГЛУБОКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ:
ВОЗМОЖНОСТИ ЕМКОСТНОГО МЕТОДА***

1. Сибирский научно-исследовательский институт гипертермии, Новосибирская обл., Искитим-5;
2. Эразмусский медицинский центр, Университетский медицинский центр Роттердама, Роттердам, Нидерланды;
3. Университет Сапиенца, Рим, Италия

О.К. Курпешев – д.м.н., консультант; Я. ван дер Зее – д.м.н., член ESHO;
М. Кавагнaro – проф., д.м.н., член IEEE, ESHO и EBEA

Содержание

Рассмотрены общие принципы проведения емкостной электромагнитной гипертермии (ЭМГТ), распределение электромагнитной энергии в различных экспериментальных моделях и опухолях больных, особенности конструкции аппликаторов различных гипертермических систем и их возможности в создании гипертермического режима в новообразованиях глубокой локализации. При классической емкостной ЭМГТ основным препятствием в достижении необходимого температурного режима в таких опухолях является перегрев подкожно-жировой клетчатки под электродами. При некоторых емкостных гипертермических системах нагрев жировой ткани еще больше усиливается из-за несоответствия конструкции аппликаторов техническим требованиям. При емкостной ЭМГТ на частотах 8–13,56 МГц получение минимального гипертермического режима возможно при выходных мощностях 500–800 Вт, максимального 1000–1200 Вт и выше.

Анализируются результаты применения различных емкостных гипертермических систем у больных со злокачественными новообразованиями внутренних органов.

Ключевые слова: лучевая терапия, химиотерапия, термолучевая терапия, термохимиотерапия, термохимиолучевая терапия, электромагнитные поля, гипертермия, емкостной метод

Поступила: 20.02.2019. Принята к публикации: 21.05.2019

* Полный русскоязычный вариант статьи размещен на сайте журнала «Медицинская радиология и радиационная безопасность» <http://www.medradiol.ru> в разделе «Выпуск № 4 2019 года».

Для цитирования: Курпешев О.К., ван дер Зее Я., Кавагнaro М. Гипертермия опухолей глубокой локализации: возможности емкостного метода // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 64–75.

DOI: 10.12737/1024-6177-2019-64-4-64-75

**A.D. Ryzhkov¹, A.S. Krylov¹, G.N. Machak², S.M. Kaspshik¹, A.B. Bludov¹,
Y.A. Shchipakhina¹, N.V. Kochergina¹**

MONITORING THE THERAPY OF OSTEOSARCOMA METASTASES WITH SPECT/CT

1. N.N. Blokhin National Medical Research Center, Moscow, Russia. E-mail: krilovas@rambler.ru;
2. Central Research Institute of Traumatology and Orthopaedics of N.N. Priorov, Moscow, Russia

A.D. Ryzhkov – Leading Researcher, Dr. Sci. Med.; A.S. Krylov – Radiologist, PhD Med.;

G.N. Machak – Dr. Sci. Med., Member of EMSOS; S.M. Kaspshik – Clinical Intern; A.B. Bludov – Researcher, PhD Med.;

Y.A. Shchipakhina – Researcher, PhD Med.; N.V. Kochergina – Leading Researcher, Dr. Sci. Med., Prof.

Реферат

A 43-year-old man presented with a history of osteogenic sarcoma of lower third of the right femur bone. In dynamic monitoring (2011–2018) in the Nuclear Medicine Department of N.N. Blokhin National Medical Research Centre of oncology, Moscow, Russia a total of 48 radionuclide diagnostic studies were performed: 24 bone scans, 19 SPECT/CT (areas of interest) and 5 dynamic scintigraphies. The results of radionuclide diagnostics allowed to identify 6 episodes of progression of the underlying condition earlier than X-ray methods of imaging in the form of appearance of new metastases in bones, right lung and continued growth of some previously identified metastases in different periods of observation. Time between relapse detection and treatment ranged from 1 to 12 months. First of all it was because of the clinicians distrust to the results of radionuclide studies that were not confirmed by X-Ray at early stages. During the relapse treatment process patient received standard and innovative therapies: 10 courses of polychemotherapy, two surgeries for endoprosthesis replacement of the right knee and femur, upper lobectomy of the right lung, radiation therapy for metastasis in the left iliac bone (total boost dose – 52 Gy), radiation therapy on the CyberKnife device on metastases in the head of the 7th right rib and metastasis in the right lung, 2 sessions of ultrasonic thermal ablation on the HIFU in the area of metastases in the neck of the right femur, 5 courses of bisphosphonates. The method of hybrid imaging of SPECT/CT allowed us to reliably monitor the effectiveness of the therapy. Postirradiation changes in osteosarcoma metastases consisted in a decrease bone (pathological) metabolism, while radio-intensity indices did not change. For the first time we observed the effect of ultrasonic thermal ablation in the treatment of bone metastases. The effect of the treatment manifested very quickly and we visualized it as a defect of accumulation of radiopharmaceutical, which is a consequence of damage to the tumor vessels and tissue necrosis. In the observation of osteosarcoma recurrence SPECT with osteotropic radiopharmaceuticals demonstrates advantages over PET with 18F-FDG. Bone scan and SPECT/CT have proven to be reliable methods of dynamic control of a patient with osteosarcoma.

Key words: SPECT/CT, bone scan, osteosarcoma, CyberKnife, HIFU

Article received: 12.03.2019. Accepted for publication: 21.05.2019

Research description

Osteogenic sarcoma and its metastases are among the most difficult tumors in treatment. On the one hand we have the improvement of traditional methods of systemic treatment (chemotherapy), and the local methods of treatment, on the other hand, thus allow us to hope that the effectiveness of treatment will increase. Monitoring the state of the disease is carried out using functional imaging methods (bone scan, SPECT, PET) and anatomy imaging methods (CT, MRI). In the past two decades, the hybrid SPECT/CT imaging method is actively introduced into clinical practice. The cause of usage of various methods of diagnostics is the need to obtain information on the state of perfusion of the tumor tissue and cell function, and on the anatomical and morphostructural changes in the focus of the tumor lesion at the same time[1]. Regarding this, it is interesting to use hybrid SPECT/CT method in the diagnosis and control of treatment of osteosarcoma metastases.

The following clinical case demonstrates the potential of bone scan and hybrid SPECT/CT methods in detecting signs of progression and regression of osteosarcoma bone metastases.

Patient (DOB 1976) ICD-10: C49.2 Malignant neoplasm: Connective and soft tissue of lower limb, including hip. Osteosarcoma of the distal right femur p(T2N0M0, stage IIB). Body build: normosthenic type, height 185 cm, weight 71 kg. The patient does not have bad habits. First symptoms of the disease appeared in December 2010 in the form of growing pains in the back of the lower third of right femur. The patient does not connect the appearance of the pain with any trauma. The patient took NSAIDs (without prescription), and this partially relieved the pain syndrome. He was consulted by a traumatologist at the clinic. X-ray of the right femoral bone revealed tumor pathology. A trepanobiopsy was performed, the results were: osteogenic sarcoma, osteoblastic variant. Appointed to N. N. Blokhin National Medical Research Centre of oncology, Moscow, Russia. Reexamination of histological blocks confirmed the diagnosis. Bone scan revealed focal lesion of the distal right femur without signs of secondary lesions in other parts of the skeleton (Fig. 1).

Scintigraphy was carried out in 2 stages. The first stage was a bone scan in 3 hours after the intravenous administration of the radiopharmaceutical ^{99m}Tc-MDP. The scintigraphy was performed in the position of the



Fig. 1. Bone scan on 28.02.2011 anterior (a) and posterior (b) projections. Starting examination. Intense accumulation of the radiopharmaceutical (1245 %) in the distal epimetaphysis of the right femur. No metastatic lesions in other parts of the skeleton

patient lying on his back using low energy high resolution collimator (LEHR). Gamma camera Symbia E or T2 Siemens Company was used. The radiopharmaceutical activity was 444 MBq. The effective dose is 2.5 mSv. The registration of impulses was carried out at an energy peak of 140 keV. The duration of bone scan was 20 minutes (the movement of the table was 12 cm/min). After obtaining a scintigraphic image of the whole body, a visual assessment was made in order to determine the localization of the pathological lesions of accumulation of the radiopharmaceutical and their sizes.

The second stage was SPECT/CT of the zone of interest. Examinations were performed on a hybrid SPECT/CT system Siemens' Simbia T2 (low-energy) system with a 2-sectional CT configuration (slice thickness 5 mm, spiral pitch 1.5 mm, focal spot size according to IAC 60 360–0.8 0 0.4 mm / 8°, 0.8×0.7 mm / 8°). Radiation exposure for scintigraphy and CT was calculated according to the Russian guidelines (MU 2.6.1. 3151–13 and MU 2.6.1.2944–11 respectively). Radiation exposure for planar scintigraphy was 2.5 mSv, for SPECT/CT varied from 1.4 to 2.2 mSv. On early stages of observation (2011–2013), the patient underwent 5 three-phase dynamic

scintigraphies to assess the perfusion of the primary tumor and its metastases (examinations were conducted during treatment and not reflected in the present work due to non-systematic studies).

In 2011, the patient received a combined treatment: neoadjuvant chemotherapy (2 courses of doxorubicin and cisplatin, 3 courses of cisplatin), after that surgical treatment was performed (03.08.2011): resection of the lower third of the right femur with simultaneous endoprosthesis of the right knee joint (Installed cement titanium endoprosthesis company ProSpon (Czech Republic). The histological conclusion: osteosarcoma of the femur with a therapeutic pathomorphosis (the volume of necrotic tumor 93 %). After surgery, 5 more courses of adjuvant chemotherapy were performed. During a control study (23.10.2012) a solitary metastases in the posterior sections of the wing of the left iliac bone was revealed (Fig. 2).

Radiotherapy of the upper half of the left iliac bone was performed (20.11.2012 – 13.12.2012). Control examination (15.11.2013) a metastasis in the neck of the right femur was suspected on bone scan, but not confirmed by X-ray (Fig. 3). Clinicians made a decision about dynamic observation of the patient. Control bone scan (06.02.2014), showed an enlarging of the lesion in the neck of the right femur and the appearance of an additional focus in the anatomical-projection of the seventh thoracic vertebra. On CT, a concretion was found in the head of the 7th right rib (Fig. 4). The council of physicians has decided that metastatic lesion of the neck of the right femur was proved. Changes in the head of the 7th right rib require dynamic observation. In March 2014 in the Central Research Institute of Traumatology and Orthopaedics of N.N. Priorov, Moscow, Russia, 2 sessions of ultrasound thermoablation on the HIFU on the area of osteoplastic metastasis in the neck of the right femur were conducted (Fig. 5). Control bone scan (15.04.2014) an increase of accumulation of radiopharmaceutical in the 7th right rib (Fig. 6). SPECT/CT of the chest was not performed. The diagnostic CT scan was performed only on 24.06.2014, which resulted in proving another relapse of the disease (Fig. 6). The patient underwent stereotactic radiotherapy on the CyberKnife robotic radiosurgical system (14.07.2014 – 16.07.2014) in the region of the right rib-vertebral articulation of the 7th thoracic vertebra in 3 fractions of 15 Gy. A control check-up (06.10.2014) confirmed the absence of relapse of the disease and the effectiveness of previous treatment (Fig. 7). During 2015, the patient was observed in the clinic without signs of the progression of the disease. 3 control bone scans and SPECT/CT of the pelvis (3) and chest (1) were performed. At the control follow-up (14.03.2016) the recurrence of the disease in the form of metastatic lesions in the apex of the right lung and right femur bone was suspected again (Fig. 8). Clinicians made a decision on dynamic

observation of the patient. Six months later (12.09.2016), forth relapses of the disease – metastases in the apical mode of the right lung and right femur (Fig. 9) were confirmed using the method of radionuclide diagnostics in the patient. However, clinicians found evidence only of metastatic lesion of the right lung proved. The patient underwent stereotactic radiation therapy on the CyberKnife radiosurgical system for metastases in the right lung.

During the control examination (01.03.2017) we found an increase in the accumulation of radiopharmaceutical in the lesion in the right femur and an increase in its size, which was a powerful evidence of a metastatic nature and a reason to start the next stage of the antitumor

therapy. The accumulation of radiopharmaceutical in the lesion in the right lung returned to normal levels, which confirms the success of the radiation therapy (Fig. 10). The patient underwent surgery on 15.07.2017: resection of the proximal right femur with total endoprosthesis of the right hip. Nuclear medicine study on 26.06.2017 did not reveal any pathological process (Fig. 11). However after 9 months, during the next control examination (12.03.2018), an increase in the level of accumulation of ^{99m}Tc -MDP in the anatomical projection of the apex of the right hemithorax was detected, it was an additional node with areas of pathological bone formation in the apex of the right lung, a relapse of the disease was suspected (Fig. 12). The patient was left under dynamic observation.

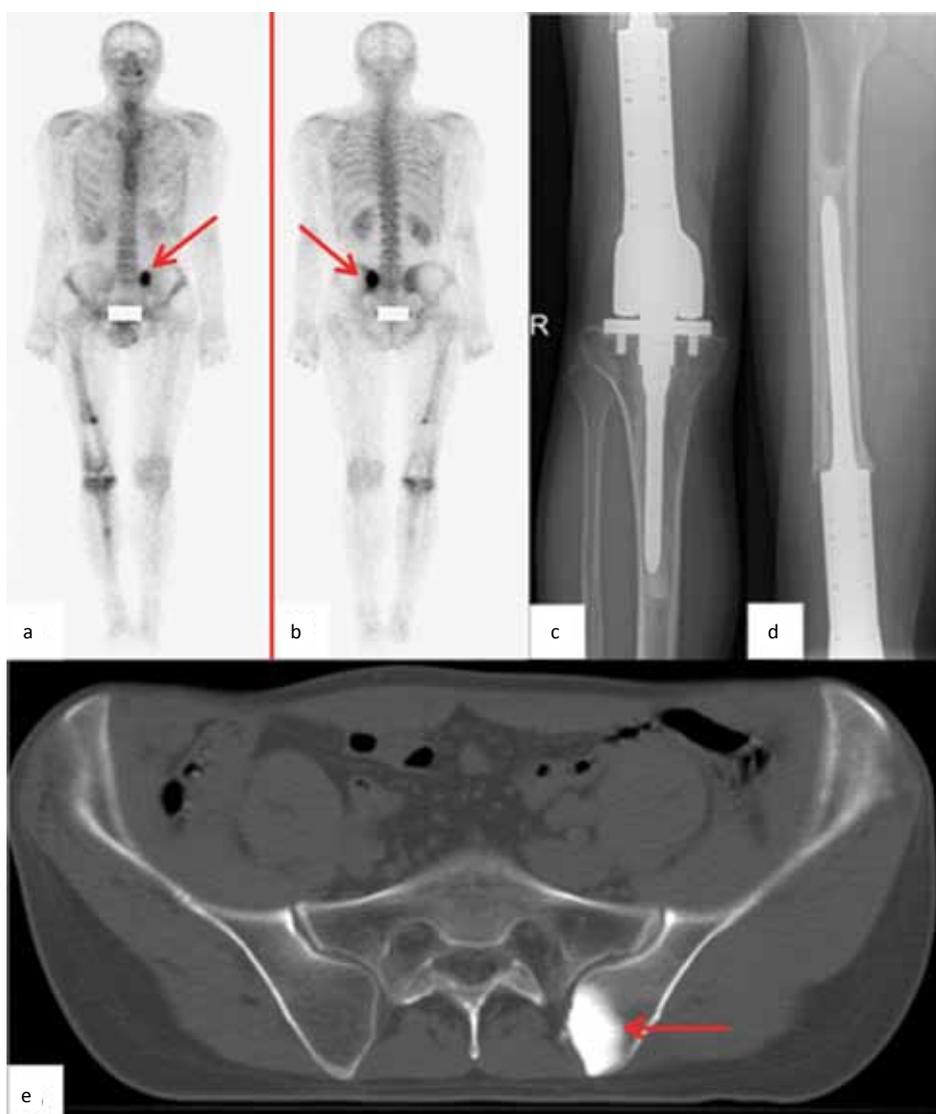


Fig. 2. Control examination on 23.10.2012. State after endoprosthesis replacement of the right knee joint. On the bone scan (a, b) a single focus of hyperaccumulation of the radiopharmaceutical in the wing of the left iliac bone (arrow). Physiologically increased accumulation of the radiopharmaceutical is in the bones that fix endoprosthesis. SPECT/CT was not performed. No pathology revealed on X-ray of the right lower limb in direct projection (c, d). On the axial cuts on CT of pelvic bones (e) in the inner segment of wing of the left iliac bone a high-density lesion (1086 HU) was detected – osteosarcoma metastasis. Progression of the underlying disease I

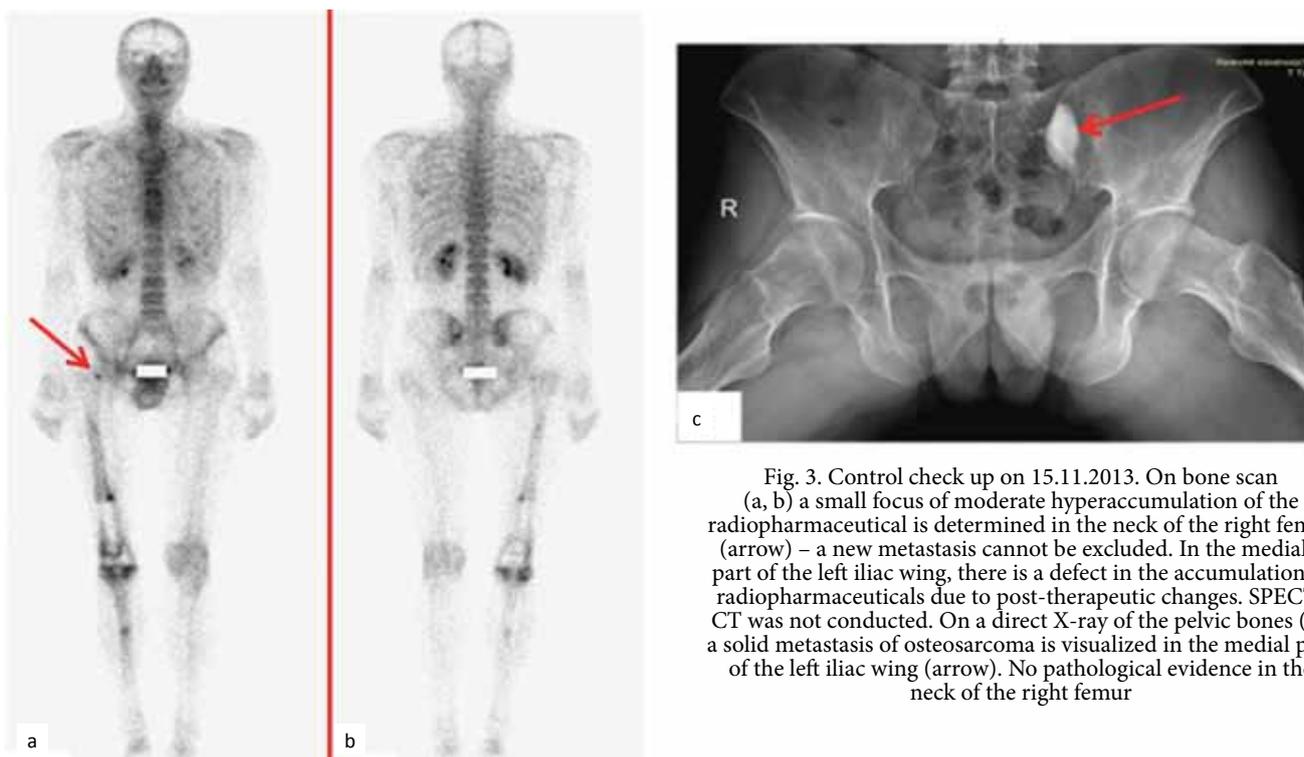


Fig. 3. Control check up on 15.11.2013. On bone scan (a, b) a small focus of moderate hyperaccumulation of the radiopharmaceutical is determined in the neck of the right femur (arrow) – a new metastasis cannot be excluded. In the medialis part of the left iliac wing, there is a defect in the accumulation of radiopharmaceuticals due to post-therapeutic changes. SPECT/CT was not conducted. On a direct X-ray of the pelvic bones (c), a solid metastasis of osteosarcoma is visualized in the medial part of the left iliac wing (arrow). No pathological evidence in the neck of the right femur

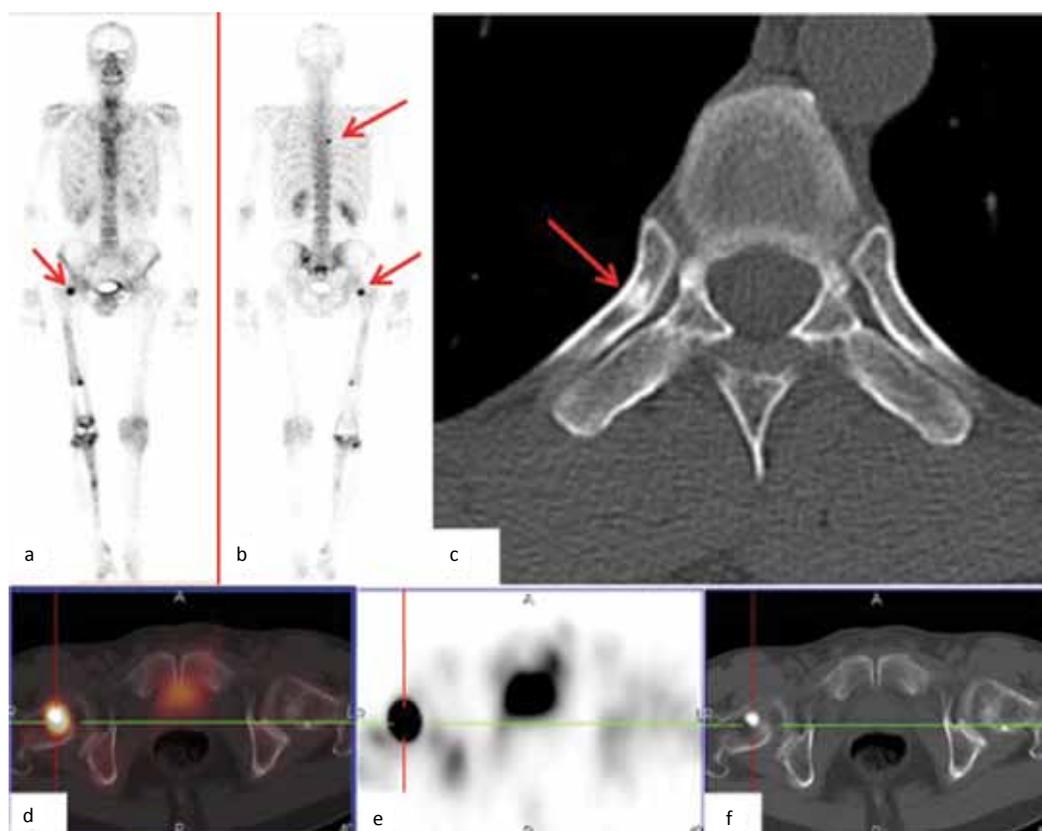


Fig. 4. Control examination on 06.02.2014. Bone scan (a, b) and SPECT/CT of pelvic, axial sections fusion (d), SPECT (e) and CT (f). Increased accumulation of the radiopharmaceutical in the right femur (arrow). On CT, a lesion of bone destruction with a high level of accumulation of (7500 %, 958 HU). Progression of the underlying disease II. An additional focus of radiopharmaceutical hyperaccumulation in the anatomical projection of the right half of Th7. On the axial cuts on CT (c) 07.02.2014, suspicion on metastasis in the head of the 7th right rib

In May 2018, the patient applied to the JCHO Tokyo Shinjuku Medical Center (Japan) for consultation and examination: bone scan and PET/CT (Fig. 13). Changes in the presented bone scan remained without significant dynamics. SPECT/CT was not performed. According to PET/CT a tumor was determined in the apex of the right lung without signs of metabolic activity. A hypermetabolic lesion (SUV = 6,2) was found in the right iliac muscle. In the medialis part of the left iliac bone, a center of osteosclerosis with signs of hypermetabolic activity (SUV = 2,8) was found. The conclusion of the Japanese colleagues on PET/CT: an active tumor tissue in the left ilium and the right iliac muscle. From May to August 2018 the patient did not visit to the oncologist. Control visit to the Nuclear Medicine Department of N.N. Blokhin National Medical Research Centre of oncology, Moscow, Russia (27.08.2018) showed increase in the level of radiopharmaceutical in pathological lesion in the right lung and an increase in their size (Fig.14). Additionally we found the destruction of the 3rd right rib, caused by the effects of postradiation osteoporosis (pathological fracture). An additional compaction of the bone tissue in the left iliac bone, with



Fig. 5. Schematic drawing, reflecting the principle of HIFU therapy. The main mechanism of therapy is thermal ablation of tissues. High energy ultrasound has the unique property of penetrating healthy tissues without damaging them, but when focused by the emitter lens in a small area, it causes an instant, within one second, temperature to 90 °C, enough for coagulative necrosis. So there is a focus of damage and necrosis. At the same time, the surface and surrounding tissues remain intact

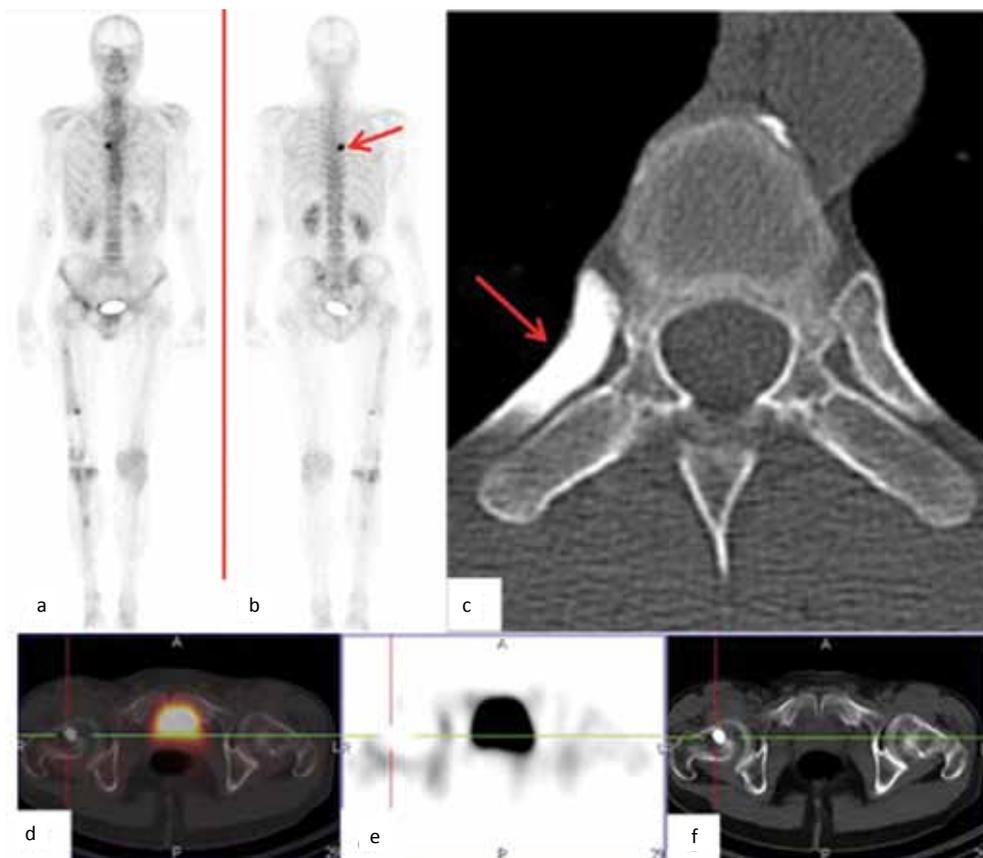


Fig. 6. Control check-up on 15.04.2014. On bone scan (a, b) and SPECT/CT of the pelvis (d, e, f) increased accumulation of in the 7th right rib (arrow). In the neck of the right femur, the center of destruction with low radiopharmaceuticals level of accumulation 44 % (977–1096 HU). Positive dynamics. The state of the left ilium without changes. On the axial cuts on CT (c), performed on 24.06.2014 a plastic metastasis in the head of the 7th right rib (arrow). The progression of the underlying disease III

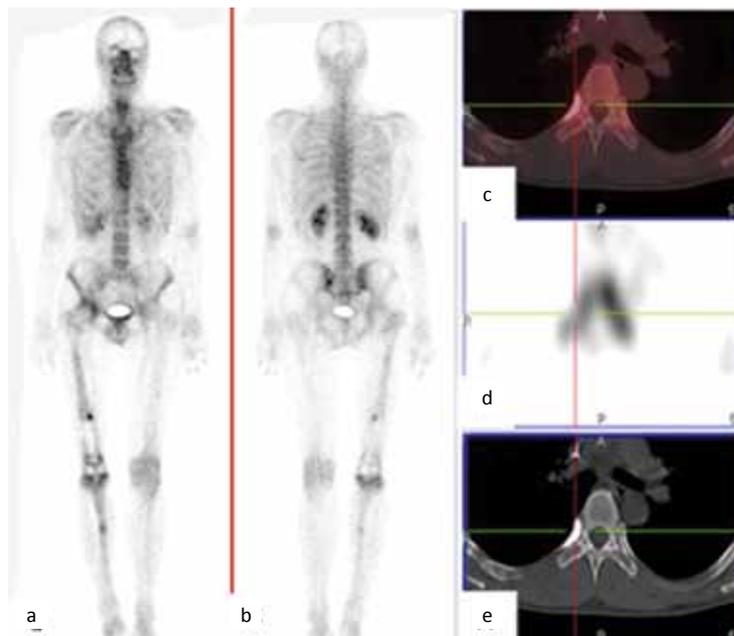


Fig. 7. Control check-up on 06.10.14. On the bone scan (a, b) and SPECT/CT of chest (c, d, e). Lower levels of accumulation of radiopharmaceutical in relation to the normal accumulation in the head of the 7th right rib state after radiation treatment. No new relapse sings

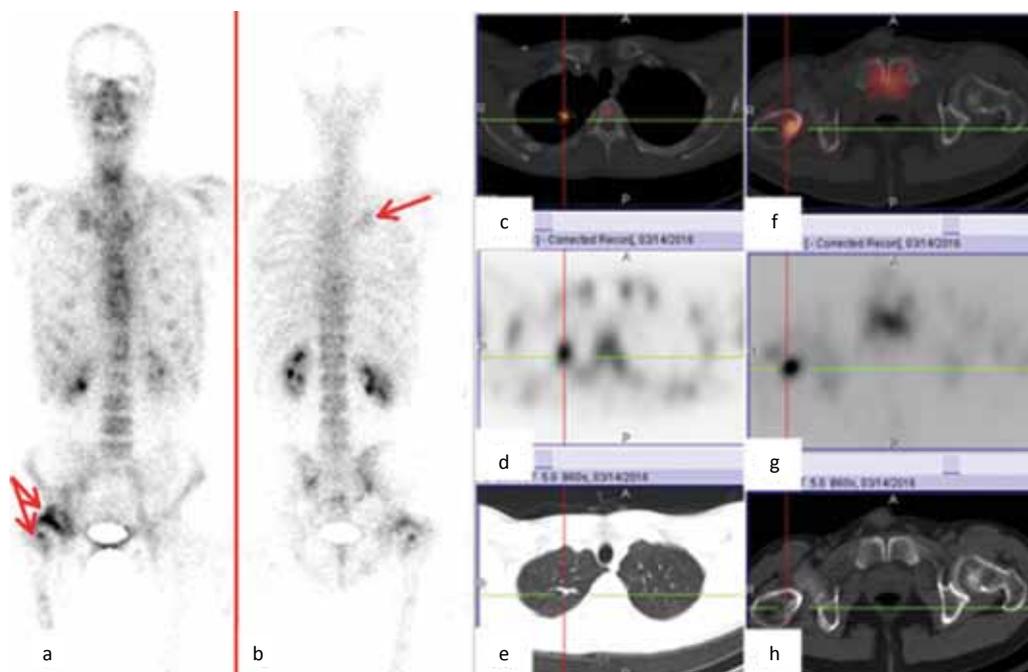


Fig. 8. Control check-up on 14.03.2016. On bone scan (a, b) focus of hyperaccumulation of the radiopharmaceutical in the upper sections of the right hemithorax is determined 300 % (arrow). Unevenly increased accumulation of radiopharmaceutical is noted in the area of the right hip joint (1034 %), with an additional focus in the proximal zone (arrows). The accumulation of radiopharmaceutical in the area of the 7th right rib and the left iliac bone is unchanged. On SPECT/CT of the chest (c, d, e) and pelvis (f, g, h) a tight focus of dense tissue with hyperaccumulation of radiopharmaceutical in the anatomical projection of the apex of the right lung. Previously it is not determined. Focus of hyperaccumulation of the radiopharmaceutical in the proximal zone of the right femur. According to CT, areas of “gentle” compaction of the bone structure. The focus was not previously determined

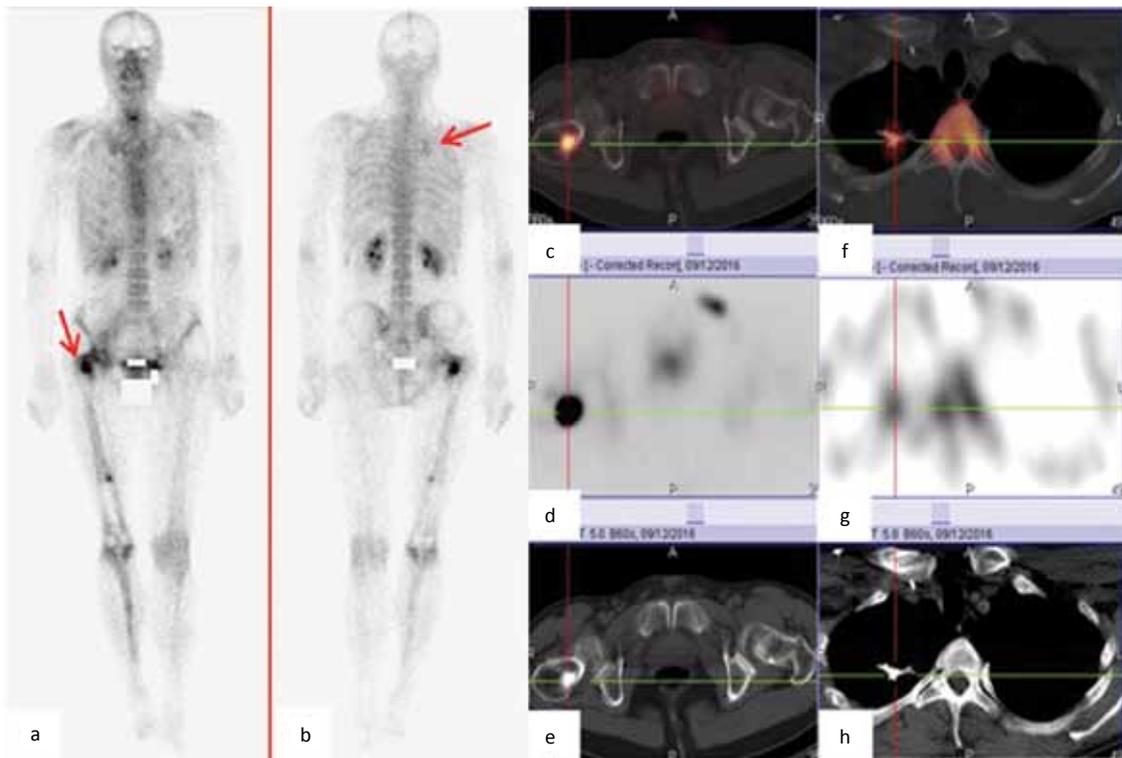


Fig. 9. Control check-up on 12.09.2016. On bone scan (a, b) the focus of hyperaccumulation of the radiopharmaceutical in the upper sections of the right hemithorax (arrow) remains the same. The level of accumulation of radiopharmaceuticals increased in the intertrochanter region of the right femur (arrow). The accumulation of radiopharmaceuticals in the area of the 7th right rib and the left iliac bone didn't changed. SPECT/CT of the pelvis (c, d, e) and chest (f, g, h). An increase of the accumulation in the proximal metaphysis of the right femur from 1034 % to 2798 %. On CT osteoblastic lesion, dense compact bone 15×17×22 mm. An increase in the size of the focus in the apex of the right lung, from 38×21×5 mm to 45×33×5 mm and increase of the level of radiopharmaceutical accumulation from 300 % to 350 %. Progression of the underlying disease IV

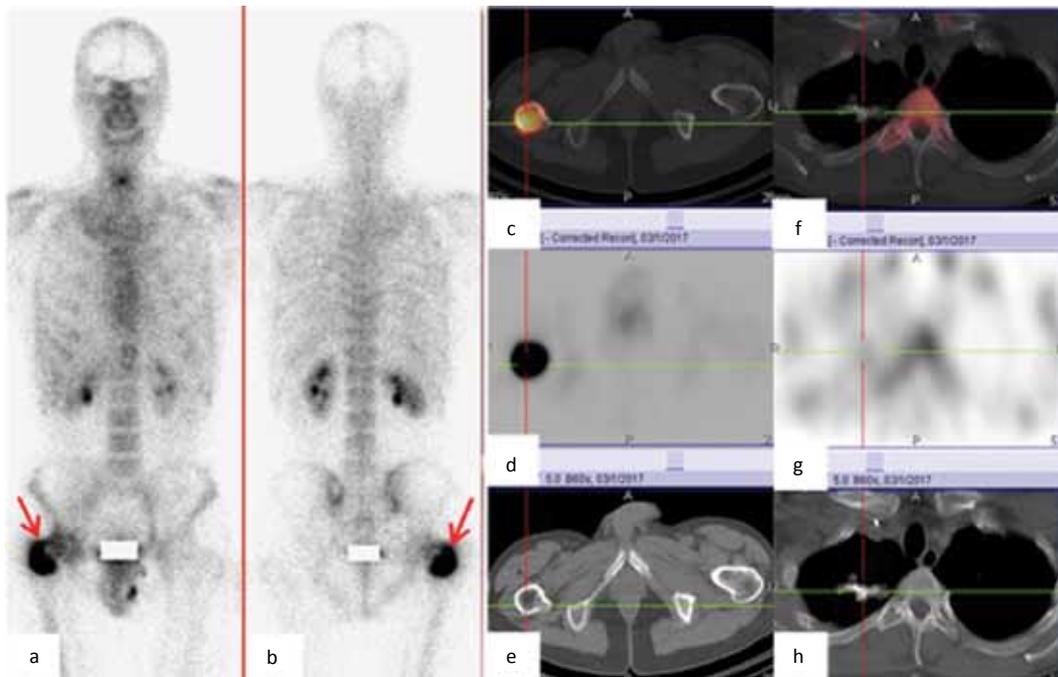


Fig. 10. Control check-up on 01.03.2017. Bone scan (a, b) and SPECT/CT of the pelvis (c, d, e) and chest (f, g, h). Hyperaccumulation of the radiopharmaceutical in the area of the proximal right femur. On CT scan, the lesion increased in size 4.5×4×3.3 cm. Progression of the underlying disease V. Accumulation of radiopharmaceutical in the lesion in the right lung normalized

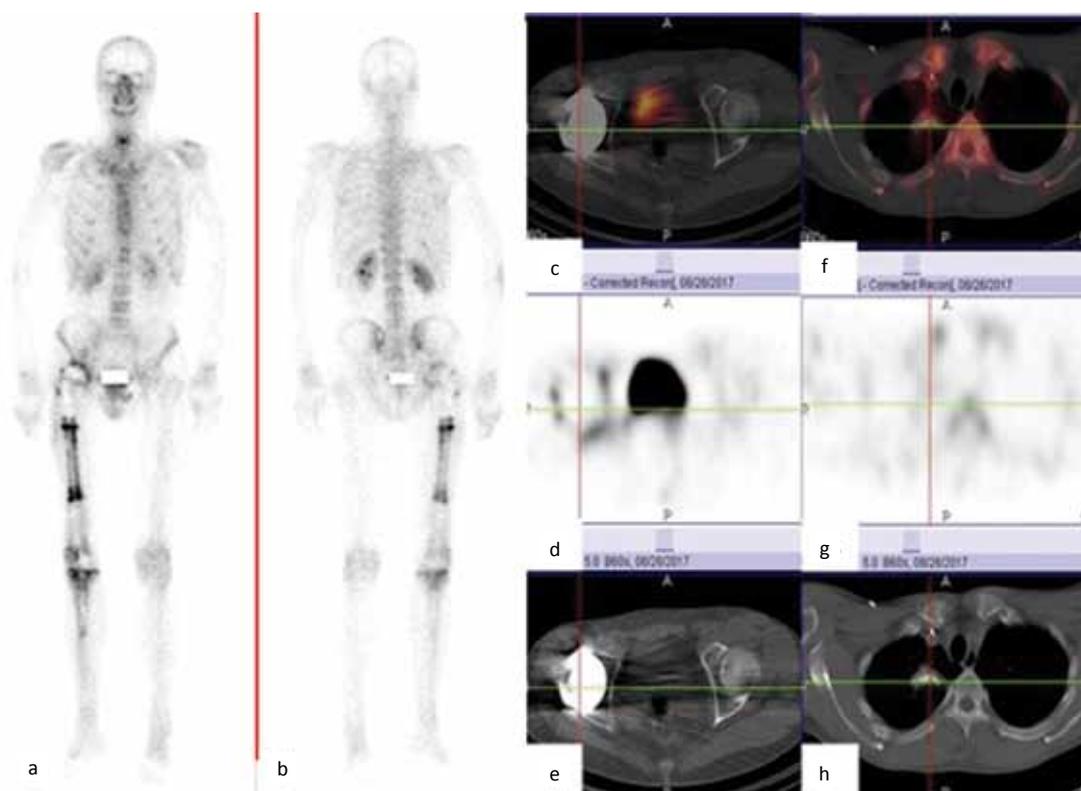


Fig. 11. Control check-up on 06.26.2017. State after resection of the proximal right femur with total endoprosthesis replacement of the right femur 03.15.2017 bone scan (a, b) and SPECT/CT of the pelvis (c, d, e) and chest (f, g, h). Hyperaccumulation of the radiopharmaceutical in the bones fixing the endoprosthesis and the surrounding soft tissues of the right thigh. On CT ossification – postoperative changes. No pathological accumulation of radiopharmaceuticals has been detected in other sites, no additional bone destruction zones have been found

hyperaccumulation of the radiopharmaceutical anterior to the previously treated metastasis was detected. It is confirmed the sixth relapse of the disease. According to the ultrasound (28.08.2018) no enlarged retroperitoneal, iliac and inguinal lymph nodes were detected.

Postoperative scars with no signs of relapse. The area of increased accumulation of 18F-FDG in the right iliac muscle corresponds to the attachment site of resected and hemmed iliac muscle to the inner wall of the pelvis (the state after the endoprosthesis of the right femur) – reactive changes. The patient was discussed at the multidisciplinary team meeting. Decision: upper lobectomy of the right lung and dynamic observation of the metastases in the left ilium. Surgical treatment was carried out on 18.09.2018 (right lung lobectomy). Histology: in lung tissue, metastatic growths of osteosarcoma of a high degree of malignancy.

Control examination (21.02.2019) no signs of underlying disease progression. No change in the left ilium, postradiation osteonecrosis suggested. We continued dynamic observation of the patient.

Discussion

In this article, we demonstrated advantages of SPECT/CT method with osteotropic radiopharmaceuticals over other diagnostic methods, including PET/CT with FDG, in the control of the patient with osteogenic sarcoma. The presented patient was repeatedly examined, bone scan from the first appointment to the clinic in 2011 to the present day [2, 3]. The results of radionuclide diagnostics allowed to identify 6 episodes of progression of the underlying disease in the form of the appearance of new metastases in the bones, in the right lung and the continued growth of old focuses at different periods of observation and in some cases several months earlier than the radiological imaging methods. Time between relapse detection and treatment ranged from 1 to 12 months. First of all it was because of the clinicians distrust to the results of radionuclide studies that were not confirmed radiologically at early stages. Only at the first recurrence of the disease, the X-ray data, combined with the results of scintigraphy, made it possible to start therapy. Whereas during next relapses, the average period was 6 months.

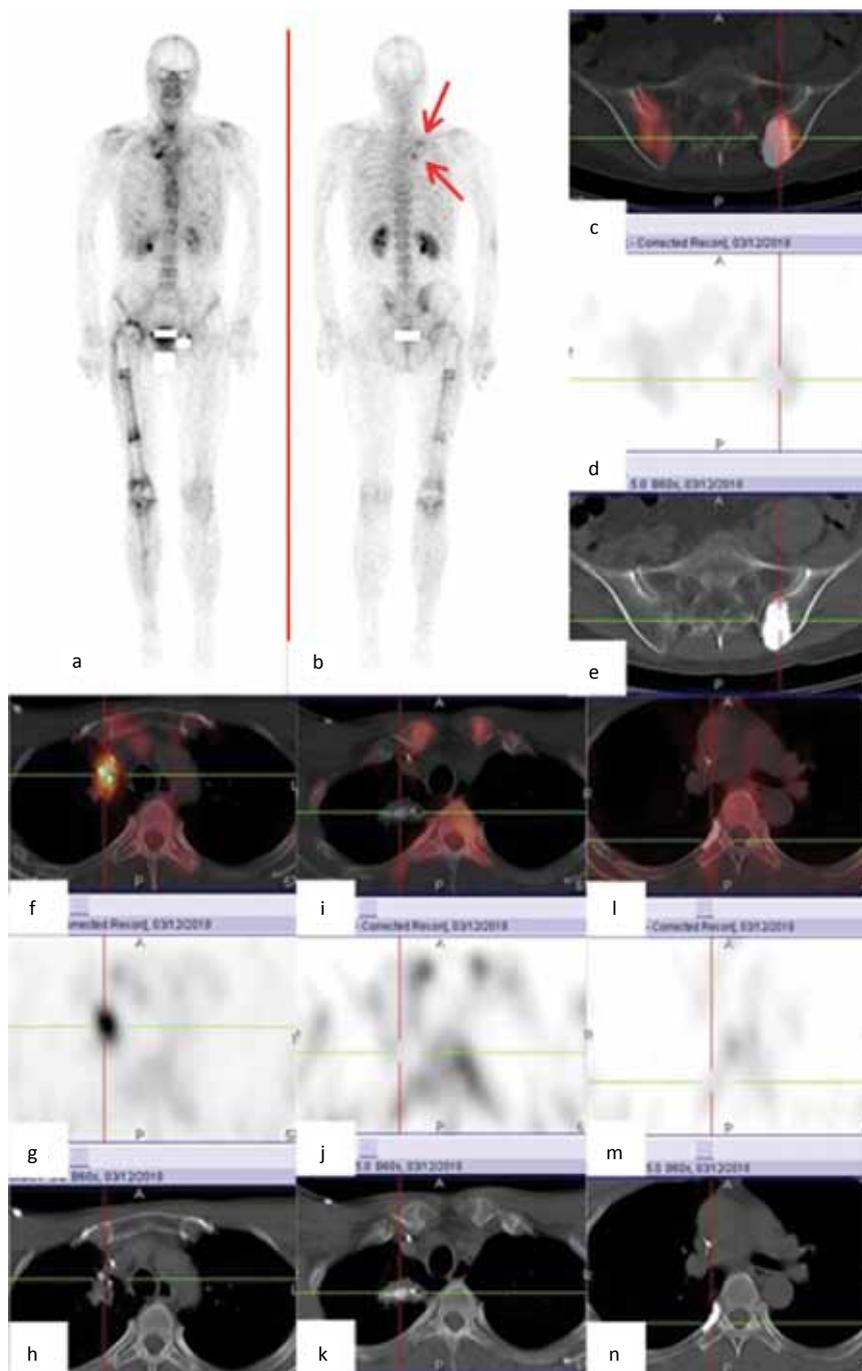


Fig. 12. Control check-up on 12.03.2018. Bone scan (a, b) and SPECT/CT of the pelvis (c, d, e) and chest different levels (f-n). On bone scan in the anatomical projection of the apex of the right hemithorax, increased accumulation of osteotropic radiopharmaceutical (arrows) manifested again. SPECT/CT showed an additional node of pathological osteogenesis in the apex of the right lung, extremely suspicious in a relapse of the disease (f, g, h). In previously identified metastases in the right lung, the level of accumulation of radiopharmaceuticals returned to normal level (i, j, k). In the 7th right rib (l, m, n) and the left ilium (c, d, e) metastases in the phase of complete reparation, with no signs of osteometabolic activity

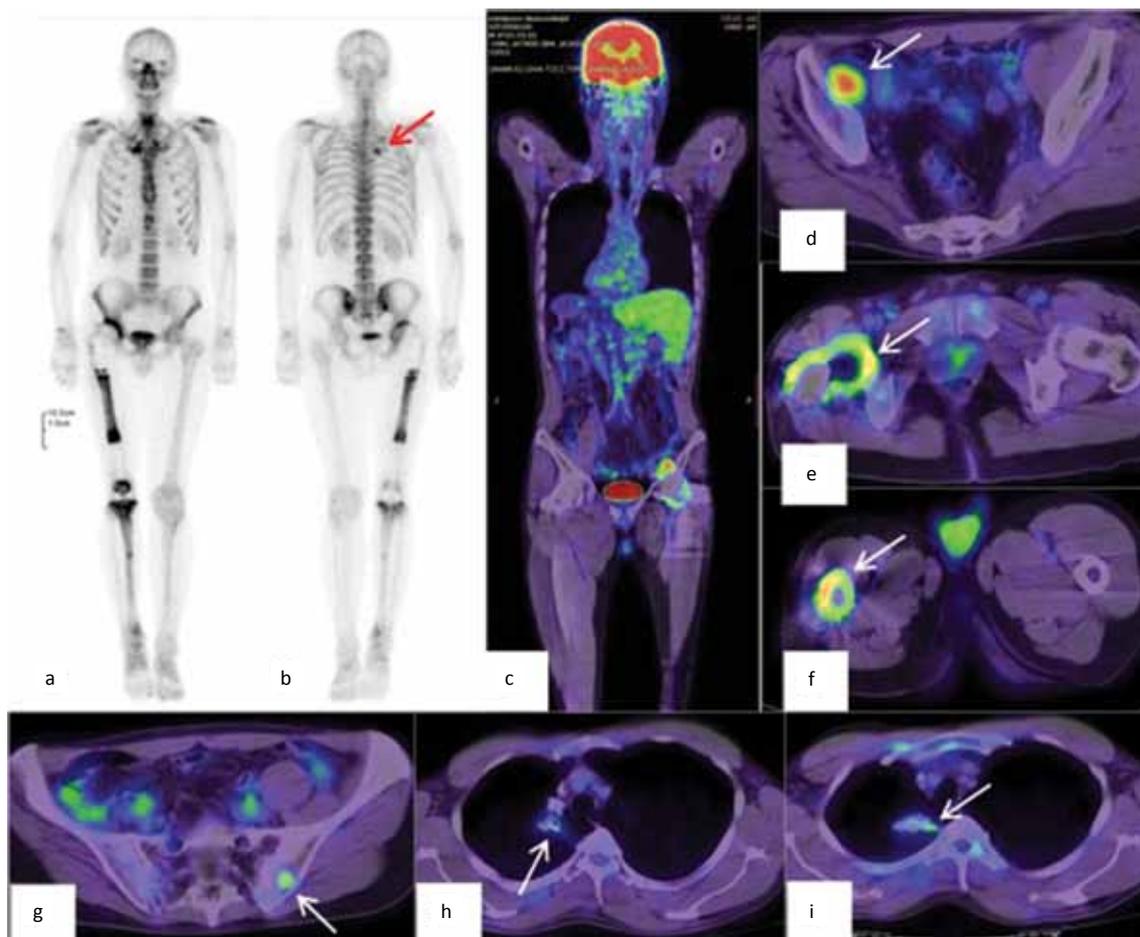


Fig. 13. Presented bone scan (a, b) on 16.05.2018 and PET/CT (c-i) on 14.05.2018 (translation). On the bone scan hyperaccumulation of the radiopharmaceutical in the apex of the right hemithorax remains without dynamics from 12.03.2018. On PET/CT (h, i) a calcified tumor is determined without pathological accumulation of ^{18}F -FDG in the apex of the right lung (arrow). Pathological hyperaccumulation of ^{18}F -FDG in the right iliac muscle, a lesion (d) with (SUV = 6,2). In the medial part of the left iliac bone (g), a concretion with signs of hypermetabolic activity (SUV = 2,8). Hyperaccumulation of the radiopharmaceutical caused by reactive changes around the endoprosthesis of the right femur (e, f). Impression: active tumor tissue in the left ilium and the right iliac muscle

Thus with the lesion in the neck of the right femur the observation period was 1 year.

It is well known that bone scan has high sensitivity and low specificity in detecting bone metastases, on the contrary CT scan has relatively lower sensitivity and high specificity. Hybrid SPECT/CT method, is able to identify nuances that could not be identified or interpreted incorrectly if this methods used separately. The possibility of simultaneous use of these two diagnostic modalities can significantly improve the diagnostic efficiency of the radionuclide diagnostic method.

Osteogenic sarcoma has high tropism to bone seeking of radiopharmaceuticals. In addition, osteosarcoma is the only tumor which extraosseous metastases also accumulate osteotropic radiopharmaceuticals during bone scan [4]. This is explained by the fact that its metastases in soft tissues (in most cases we are talking about lung lesions) at the final stage of their development acquire

histopathological properties similar to bone tissue – the ability of pathological osteogenesis. Our patient has a variant of osteoblastic osteosarcoma with a high degree of calcification of both the primary tumor and its metastases in the bones and lung.

Such features of the pathophysiology of the tumor are clearly demonstrated by the possibilities of PET/CT and SPECT/CT performed within a similar time frame during the development of 6 recurrences of the disease before the start of therapy. So ^{18}F -FDG has intensively accumulated in those areas of the tumor where the process of osteogenesis has not been completed yet. PET has a false-positive result due to incorrect identification of the inflammatory focus. The Japanese colleagues did not take into account previous surgical intervention. SPECT/CT showed a high level of accumulation of osteotropic radiopharmaceuticals in those areas of the tumor, where active ossification occurs (dense focuses) and moderate

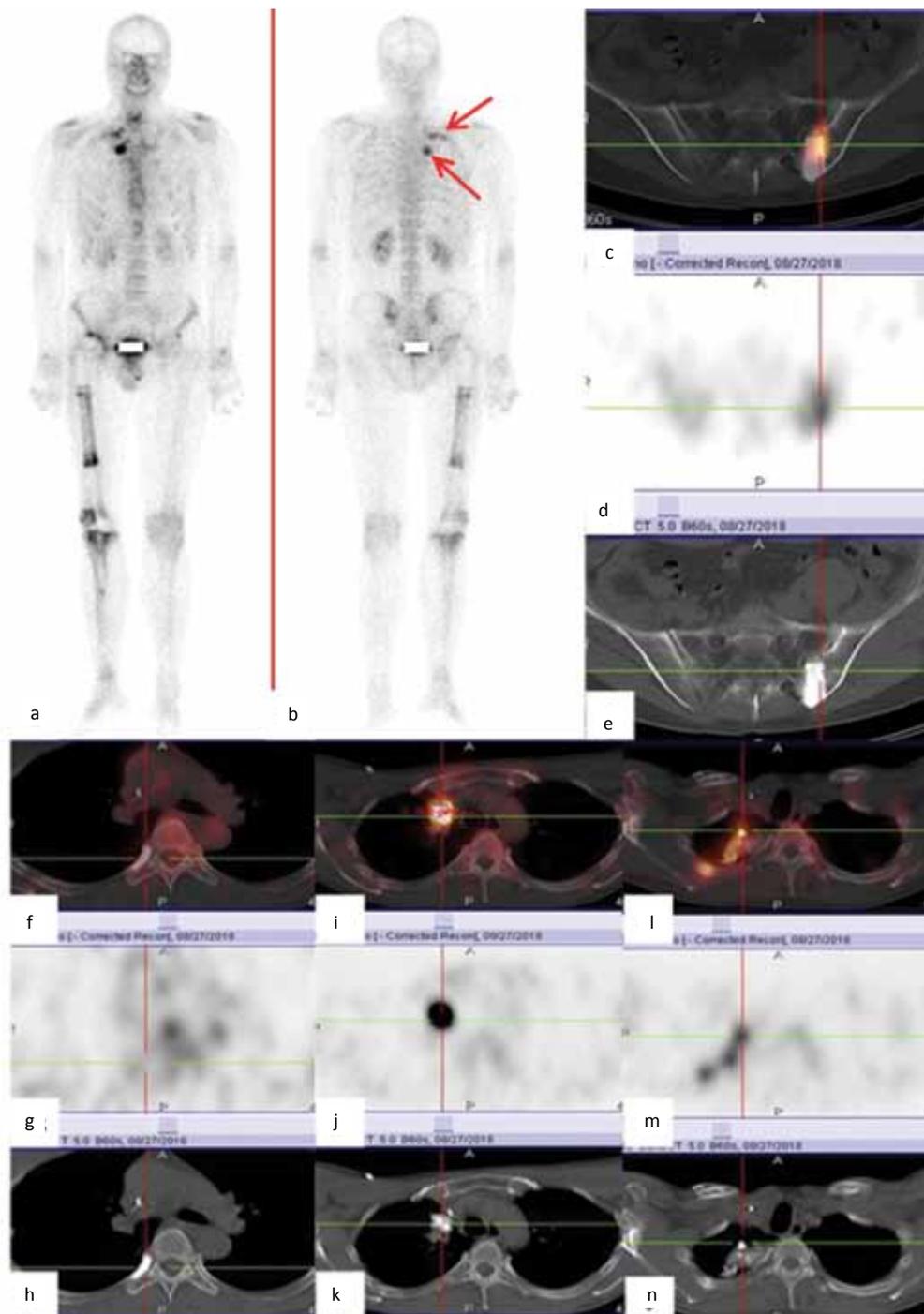


Fig. 14. Control examination on 27.08.2018, bone scan (a, b) and SPECT/CT of the pelvis (c, d, e) and chest (f-n). On bone scan pathological focus of hyperaccumulation of the radiopharmaceutical in the apex of the right hemithorax (arrows). Compared with the presented Tokyo bone scans the accumulation level of the radiopharmaceutical has increased. On SPECT/CT there is an increase in the accumulation of radiopharmaceutical in pathological foci and an increase in their size. Additionally we found a focus of accumulation of the radiopharmaceutical in the posterior segment of the 3rd right rib with bone destruction on CT – pathological fracture caused by post-radiation osteoporosis (l, m, n). In the medialis part of the wing an additional osteosclerotic formation was formed with hyperaccumulation of the radiopharmaceutical near previously treated metastasis (i, j, k). Metastasis in the head of the 7th right rib in the phase of complete reparation (f, g, h)

in less dense areas, excluding the accumulation of reactive changes in the right iliac muscle in the area.

In addition to high sensitivity and specificity in detecting recurrences of osteosarcoma, SPECT/CT allowed to monitor the effectiveness of the treatment. Post radiotherapy changes in osteosarcoma metastases manifested in decreased bone tissue metabolism below normal levels. At the same time, the Hounsfield intensity did not change. This observation demonstrates the obvious benefits of SPECT/CT in the diagnosis and follow-up of patients with metastatic bone lesions and suggests a wider application of this method.

Summary

1. The patient during the observation made 26 visits to the Nuclear Medicine Department of N. N. Blokhin National Medical Research Centre of oncology, Moscow, Russia. 48 examinations with osteotropic radiopharmaceuticals: 24 bone scan, 19 SPECT/CT, 5 dynamic studies.

2. Bone scan and SPECT/CT allowed us to identify 6 episodes of progression of the underlying disease in the form of metastatic lesions of the skeleton and right lung, as well as continued growth of certain old metastasis at different times of observation and 6 months (average) earlier than X-rays and CT.

3. Hybrid SPECT/CT is a demonstrative method capable of detecting nuances that could not be identified or misinterpreted when modalities applied separately, thus increase the diagnostic efficiency of the radionuclide method.

4. For the first time we observed the effect of ultrasound thermoablation in the treatment of bone metastases [5]. The effect of treatment manifested very quickly. Defect of accumulation of radiopharmaceutical

is a result of damage to the tumor vessels and the manifestation of tissue necrosis.

5. Post radiotherapy changes in osteosarcoma metastases showed in the reduction of bone (pathological) metabolism [6]. Hounsfield intensity units do not change.

6. We demonstrate the advantage of SPECT with osteotropic radiopharmaceuticals over PET with ¹⁸F-FDG in the observation of osteosarcoma recurrence.

REFERENCES

1. Krzhivitsky PI, Kanaev SV, Novikov SN, Zhukova LA, Ponomareva OI, Negustorov YuF. SPECT-CT in the diagnosis of metastatic skeletal lesion. *Problems in Oncology*. 2014;60(1):56-63. (Russian).
2. Ryzhkov AD, Ivanov SM, Shiryaev SV, Krylov AS, Stanyakina EE, Kochergina NV, et al. SPECT/CT radiation in treatment of bone metastases of osteosarcoma. *Problems in Oncology*. 2016; 62(5):654-9. (Russian).
3. Ryzhkov AD, Shiryaev SV, Machak GN, Kochergina NV, Shchipakhina YaA, Krylov AS, et al. SPECT/CT in Treatment Monitoring of Bone Metastases of Osteosarcoma with Ultrasound Thermal Ablation Method. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2016;61(5):54-8. (Russian).
4. Mebarki M, Medjahedi A, Menemani A, Betterki S, Terki S, Berber N. Osteosarcoma pulmonary metastasis mimicking abnormal skeletal uptake in bone scan: utility of SPECT/CT. *Clin Nucl Med*. 2013;38(10):392-4. DOI: 10.1097/RLU.0b013e318266cdcb.
5. TerHaar G. HIFU Tissue Ablation: Concept and Devices. *Adv Exp Med Biol*. 2016;880:3-20. DOI: 10.1007/978-3-319-22536-4_1.
6. Nasarenko AV, Ter-Arutyunyan SA Stereotactic radiation therapy (SRT) in the treatment of primary and metastatic bone lesions. *Bone and Soft Tissue Sarcomas, Tumors of the Skin*. 2016(1):36-44. (Russian).

For citation: Ryzhkov AD, Krylov AS, Machak GN, Kaspshik SM, Bludov AB, Shchipakhina YA, Kochergina NV. Monitoring the Therapy of Osteosarcoma Metastases with SPECT/CT. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2019;64(4): 76-88. (English).

DOI: 10.12737/1024-6177-2019-64-4-76-88

**А.Д. Рыжков¹, А.С. Крылов¹, Г.Н. Мачак², С.М. Каспшик¹, А.Б. Блудов¹,
Я.А. Щипахина¹, Н.В. Кочергина¹**

МОНИТОРИНГ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАСТАЗОВ ОСТЕОСАРКОМЫ С ПОМОЩЬЮ ОФЭКТ/КТ*

1. Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ, Москва.

E-mail: krilovas@rambler.ru;

2. Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова Минздрава РФ, Москва

А.Д. Рыжков – в.н.с., д.м.н.; А.С. Крылов – к.м.н., врач-радиолог; Г.Н. Мачак – д.м.н., член Европейского общества по изучению костно-мышечных опухолей; С.М. Каспшик – клинический ординатор; А.Б. Блудов – н.с., к.м.н.; Я.А. Щипахина – н.с., к.м.н.; Н.В. Кочергина – в.н.с., д.м.н., проф.

Реферат

Представлен клинический случай наблюдения с 2011 по 2018 гг. мужчины 1976 г. рождения с диагнозом остеогенной саркомы нижней трети правой бедренной кости. В процессе динамического наблюдения в лаборатории радиоизотопной диагностики НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина пациенту проведено 48 радионуклидных диагностических исследований: 24 остеосцинтиграфии в режиме всего тела, 19 ОФЭКТ/КТ зоны интереса и 5 динамических скинтиграфий. Результаты радионуклидной диагностики позволили первыми выявить 6 эпизодов прогрессирования основного заболевания в виде появления новых метастазов в костях, правом легком и продолженного роста отдельных ранее выявленных метастазов в разные сроки наблюдения, причем раньше, чем рентгенологическим методом визуализации. Время от обнаружения рецидива заболевания по данным скинтиграфии до начала терапии составляло от 1 до 12 мес. Связано это, в первую очередь, с недоверием клиницистов к результатам радионуклидных исследований, не подтвержденным на ранних этапах рентгенологически. В процессе лечения рецидивов основного заболевания пациент получил следующие стандартные и инновационные виды терапии: 10 курсов ПХТ, две операции по эндопротезированию правого коленного сустава и бедренной кости, верхняя лобэктомия правого легкого, дистанционная лучевая терапия на метастаз в левой подвздошной кости (СОД 52 Гр), лучевая терапия на аппарате «Кибернож» на метастаз в головке 7-го правого ребра и метастаз в правом легком, 2 сеанса ультразвуковой термоабляции на аппарате HIFU в области метастаза в шейке правой бедренной кости, введение бисфосфонатов – 5 курсов. Метод гибридной визуализации ОФЭКТ/КТ позволил надежно контролировать эффективность проводимой терапии. Постлучевые изменения в метастазах остеосаркомы заключаются в снижении костного (патологического) метаболизма, тогда как показатели радиоденситивности не изменяются. Впервые наблюдали эффект ультразвуковой термоабляции при лечении метастазов в костях. Эффект от лечения проявляется очень быстро и наглядно в виде дефекта накопления РФП, который является следствием повреждения сосудов опухоли и проявлением некроза тканей. Продемонстрировано преимущество ОФЭКТ с остеотропным РФП над ПЭТ с ¹⁸F-ФДГ в наблюдении рецидива остеосаркомы. ОСГ и ОФЭКТ/КТ показали себя надежным методом динамического контроля за пациентом с остеогенной саркомой.

Ключевые слова: ОФЭКТ/КТ, сканирование скелета, остеогенная саркома, Кибернож, фокусированный ультразвук высокой интенсивности

Поступила: 12.03.2019. Принята к публикации: 21.05.2019

* Полный русскоязычный вариант статьи размещен на сайте журнала «Медицинская радиология и радиационная безопасность» <http://www.medradiol.ru> в разделе «Выпуск № 4 2019 года».

Для цитирования: Рыжков А.Д., Крылов А.С., Мачак Г.Н., Каспшик С.М., Блудов А.Б., Щипахина Я.А., Кочергина Н.В. Мониторинг лечения метастазов остеосаркомы с помощью ОФЭКТ/КТ // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 76–88.

DOI: 10.12737/1024-6177-2019-64-4-76-88