

В. Я. ГОТЛИБ, И. И. ПЕЛЕВИНА, Г. Г. АФАНАСЬЕВ, Л. П. ЛИПЧИНА

**ИЗМЕНЕНИЕ ЛЕТАЛЬНОГО ЭФФЕКТА ОБЛУЧЕНИЯ
ПРИ ПОМОЩИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В УСЛОВИЯХ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ВНЕ ОРГАНИЗМА**

(Представлено академиком Г. М. Франком 25 VIII 1969)

Изменение радиочувствительности клеток химическими соединениями открывает пути для изучения уникальных структур, повреждение которых приводит к гибели клетки. Следует учитывать, что многие химические соединения в зависимости от концентрации, времени контакта с клетками до облучения, временных интервалов введения их после облучения, условий аэрации и т. д. оказывают разный эффект, в одних случаях усиливая, в других — уменьшая реакцию клеток на облучение.

Для оценки радиочувствительности и ее изменения необходимы строгие количественные критерии, позволяющие характеризовать наиболее существенные и важные реакции клеток на облучение. Одной из таких реакций является изменение репродуктивной способности клеточной популяции, а методом, дающим возможность ее количественной оценки, — метод клонирования единичных клеток и изучение их способности к размножению (1).

В данной работе изучали возможность модификации радиочувствительности клеток в культуре ткани при помощи одного из ингибиторов радикальных реакций (2).

Объектом исследования служили клетки линии LL, полученные из асцитного лимфолейкоза NKLy мышей (3), условия клонирования которых подробно описаны в работе (4).

В опытах использовали монодисперсные клетки семидневной культуры, которые высевали в чашки Петри диаметром 60 мм и инкубировали в среде 199 с 20% сыворотки крупного рогатого скота при температуре 37° и постоянном составе газовой среды (95% воздуха и 5% CO₂). В описанных выше условиях эффективность посева (отношение числа выросших колоний к числу эксплантированных клеток) составляла 70—80%.

Облучение производили при комнатной температуре в чашках Петри через 18 час. после посева, на стадии одиночных клеток в дозах 100—700 р γ-лучами Co⁶⁰, на установке ГУТ — Co⁶⁰ при мощности дозы 100 р/мин и расстоянии от источника 26 см.

Изучали возможность модификации действия облучения при помощи пропилового эфира галловой кислоты (ПГ), который растворяли в подогретой среде 199 и добавляли к клеткам за 18 час. и за 15 мин. до облучения. Конечная концентрация ПГ в чашках составляла 2,0 · 10⁻⁵ М. Клетки находились в контакте с ПГ в течение всего периода культивирования.

Через 10 дней инкубации образовавшиеся колонии окрашивали толундиновым синим и подсчитывали их количество в каждой чашке. В контроле определяли эффективность посева, во всех остальных случаях — выжившую фракцию клеток (отношение числа колоний в опытных чашках к числу колоний в соответствующем контроле). На основании экспериментальных данных строили кривые доза — эффект (методом наименьших квадратов) и рассчитывали 95% доверительную зону этих кривых (5).

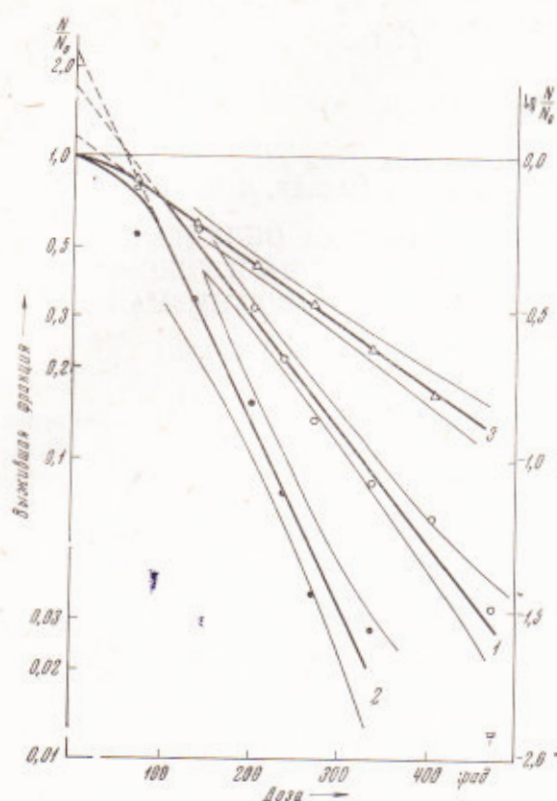


Рис. 1. Кривые выживаемости клеток LL. 1 — после γ -облучения, 2 — действия пропилгаллата в течение 18 час. и последующего облучения, 3 — действия пропилгаллата в течение 15 мин. и облучения. Уравнения прямых регрессии: 1 — $\lg(N/N_0) = -3,58(D - 0,27) - 0,74$; 2 — $\lg(N/N_0) = -5,85(D - 0,23) - 0,99$; 3 — $\lg(N/N_0) = -1,94(D - 0,25) - 0,42$. Показаны границы 95% доверительных зон для каждой прямой, рассчитанные по табл. 4.6а из (5)

прикрепившимся к стеклу. Тот факт, что выжившая фракция в обоих случаях была одинаковой, указывает на отсутствие влияния ПГ на прикрепление клеток.

Изменение репродуктивной способности клеток при воздействии ПГ в разных концентрациях оказалось:

Концентрация ПГ (M)	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$
Выжившая фракция клеток	0,90	0,70	0,10	0,02

ПГ в концентрации $5,0 \cdot 10^{-5} - 1,0 \cdot 10^{-4}$ M токсичен для клеток и вызывает резкое снижение их выживаемости. Нами была выбрана доза $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, которая приводит к незначительному уменьшению выживаемости.

При добавлении ПГ за 18 час. до облучения (кривая 2) наклон дозой кривой выживаемости значительно изменяется: D_0 уменьшается до 74 рад, а экстраполяционное число несколько увеличивается (2,25 по сравнению с 1,68 после одного облучения).

Изменение наклона дозой кривой выживаемости указывает на то, что ПГ в этих условиях значительно повышает радиочувствительность данной

На рис. 1 представлены кривые выживаемости клеток линии LL при облучении и совместном действии ПГ и облучения. Эти кривые можно охарактеризовать двумя параметрами: D_0 — дозой, которая необходима для уменьшения выживаемости в e раз, т. е. до $1/2,72 = 0,37$, определяемой на прямолинейном участке кривой, и n — экстраполяционным числом, представляющим собой точку на ординате при продолжении прямолинейного участка кривой до 0 дозы. Эти два параметра принято считать характеристикой радиочувствительности клеточных линий.

При облучении (кривая 1) D_0 составляет 121 рад, $n = 1,68$. Наличие «плеча» у кривой, т. е. тот факт, что $n > 1$, говорит о накоплении сублетальных повреждений (6).

В другой серии опытов к клеткам добавляли ПГ в разное время до облучения. Предварительно необходимо было выяснить, влияет ли ПГ на прикрепление клеток к стеклу и не вызывает ли значительного уменьшения выживаемости. Для этого вещество добавляли в суспензию клеток и к клеткам,

клеточной популяции, что выражается в повышении гибели клеток (отношение D_0 при облучении с ПГ к D_0 при облучении без ПГ равно 1,6).

При добавлении ПГ за 15 мин. до облучения (кривая 3) отмечается снижение радиочувствительности клеток, D_0 увеличивается до 223 рад, при одновременном уменьшении экстраполяционного числа до 1,13.

Значения наклонов кривых, D_0 , экстраполяционных чисел со стандартными ошибками и доверительными интервалами приведены в табл. 1.

Как следует из экспериментальных данных, радиосенсибилизация и радиозащита вызываются веществом, введенным в одной и той же кон-

Таблица 1

Значения наклонов, D_0 и экстраполяционных чисел кривых выживаемости клеток линии LL, рассчитанные методом линейной регрессии, после облучения в различных условиях

Воздействие	№№ опытов	Число отдельных определений выживших фракций	Конечный наклон кривых выживаемости \pm стандартная ошибка * ($b \pm \sigma_b$)	Экстраполяционное число		D_0 ***, рад
				n	$-\sigma - + \sigma$ **	
Облучение Пропилгаллат за 18 час. до облучения за 15 мин. до облучения	24—32	145	$-3,58 \pm 0,21$	1,68	0,84—2,39	121
	24—27	50	$-5,85 \pm 0,66$	2,25	0,91—5,56	74
	28—30,33	68	$-1,94 \pm 0,14$	1,13	0,91—1,39	223

$$* \sigma_b = \pm S / \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

** $\sigma_n = \pm v_{n-2} (p, \lambda) S \sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2} + \frac{1}{n}}$, где $p = 0,95$; λ и v рассчитаны по табл. 4. 6а (*) при $x = 0$.

*** $D_0 = \lim_{N \rightarrow 0} \frac{dD}{d \ln N}$, т. е. величина, обратная конечному наклону кривых выживаемости.

центрации, в одинаковых условиях культивирования, и зависят только от продолжительности контакта его с клетками до облучения. Можно полагать, что в сенсибилизирующем эффекте основную роль играют продукты метаболизма ПГ, образующиеся в клетках или питательной среде в течение 18 час. до облучения. Вполне вероятно также, что действие облучения усиливается относительно долгоживущими радикалами, образующимися из ПГ в тех условиях, которые существуют в клетках. Эти продукты могут играть определенную роль в процессе самого облучения. Кроме того, за длительное время контакта с клетками они могут вызывать повреждения жизненно важных структур клетки (изменение структуры ДНК, уменьшение содержания веществ, ответственных за уровень естественной клеточной защиты, например, SH-групп и др.), которые будут приводить к увеличению радиочувствительности клеток. Взаимодействие возникших повреждений с повреждениями тех же самых компонентов, вызванных облучением, также приводит к снижению выживаемости.

Радиозащитное же действие ПГ при его введении за 15 мин. до облучения может быть обусловлено реакцией его с радикалами, образующимися при облучении, и их инактивирующей.

Реакцию клеток линии LL на облучение и совместное действие ПГ и облучения можно рассматривать с двух точек зрения: 1) изменения летального эффекта (экспоненциальная часть кривой, характеризуемая дозой D_0) и 2) влияния на повреждения, которые могут не приводить к гибели (область плеча, характеризуемая его шириной, пороговой дозой, при которой проявляется летальный эффект). Из приведенных данных следует, что ПГ в зависимости от времени контакта с клетками, может или увеличивать или уменьшать летальное действие γ -лучей: D_0 изменяется от

120 рад при одном облучении до 74 и 223 рад. Наличие плеча у описанных кривых выживаемости означает, что повреждения накапливаются прежде чем регистрируется летальный эффект (⁷). Численным параметром ширины плеча может служить доза, получаемая при экстраполяции экспоненциальной части кривой выживаемости к абсциссе, соответствующей 100% выживаемости (D_q). Оказывается, что $D_q = 60$ рад при облучении и при добавлении ПГ за 18 час. до облучения не изменяется. Однако введение ПГ за 15 мин. до облучения уменьшает D_q в 2 раза — до 28 рад.

Авторы выражают глубокую благодарность акад. Н. М. Эмануэлю за интерес к работе и обсуждение результатов.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
4 VIII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. T. Puck, P. Marcus, J. Exp. Med., 103, 653 (1956). ² Н. М. Эмануэль, Тр. МОИП, 7, 73 (1963). ³ Т. А. Никольская, Л. П. Липчина и др., Цитология, 9, 486 (1969). ⁴ В. Я. Готлиб, И. И. Пелевина, Г. Г. Афанасьев, Изв. АН СССР, сер. биол., 4, 539 (1969). ⁵ Л. Н. Большев, Н. В. Смирнов, Таблицы математической статистики, «Наука», 1965, стр. 81. ⁶ M. M. Elkind, H. Sutton, Radiation Res., 13, 556 (1960). ⁷ M. M. Elkind, H. Sutton-Gilbert et al., Nature, 214, 1088 (1967).