

К. Г. МОСКАЛИК, А. П. КОЗЛОВ, А. А. АКИМОВ

**ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЯ БЫСТРЫМИ
ЭЛЕКТРОНАМИ НА РАЗМНОЖЕНИЕ И СИНТЕЗ ДНК
В КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ ЛИМФОМЫ МЫШЕЙ**

(Представлено академиком Г. М. Франком 31 X 1974)

В настоящее время использование мегавольтных излучений (гамма- и тормозного излучений, быстрых электронов) в лучевой терапии злокачественных опухолей опирается на преимущества, обусловленные пространственным распределением дозы этих излучений в теле больного (1). Однако дальнейшее повышение эффективности лучевого лечения мегавольтными излучениями лежит на путях нахождения оптимальных режимов временного распределения дозы. С этой целью в онкорadiологических центрах широко исследуются терапевтические возможности различных курсов фракционированного облучения. Между тем, отсутствие информации о поведении клеточных популяций злокачественных и нормальных тканей при разных режимах фракционирования дозы не позволяет выйти этим клиническим исследованиям за рамки эмпиричности.

Цель настоящей работы — исследование интенсивности клеточного размножения и способности опухолевых клеток к синтезу ДНК после различных режимов фракционированного облучения.

Опыты выполнены на асцитной лимфоме NK/Ly, поддерживаемой путем внутрибрюшинной перевивки $\sim 5 \cdot 10^6$ клеток мышам-самцам линии SHR. На 3 сутки после трансплантации опухолевых клеток животных подвергали общему облучению электронами, генерируемыми линейным ускорителем электронов ЛУЭ-25. Применяли следующие режимы фракционирования дозы быстрых электронов: 1) ежедневное облучение разовой дозой 200 рад (всего 5 фракций за 5 дней); 2) среднее фракционирование с облучением разовой дозой 333 рад три раза в неделю (3 фракции за 5 дней) и 3) крупное фракционирование с облучением разовой дозой 500 рад два раза в неделю с промежутком времени между сеансами в 4 суток (2 фракции за 5 дней). Суммарная доза при всех режимах облучения составляла 1000 рад. Мощность дозы 90—100 рад/мин. Энергия электронов 20 Мэв. Определение митотической активности и доли клеток, синтезирующих ДНК, производили спустя 0, 5, 1, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 и 120 час. после последнего сеанса при всех режимах фракционированного облучения. Н-тимидин (уд. актив. 11,6 С/ммоль) вводили внутрибрюшинно в дозе 0,5 мкС/г. Мышей умерщвляли через 1 час после инъекции изотопа. Извлекали асцитическую жидкость и приготавливали мазки. Последние покрывали жидкой эмульсией типа «М». Автографы экспонировали в течение 7 дней и после проявления окрашивали азур-эозином по Романовскому и подсчитывали число митозов на 5000 опухолевых клеток с пересчетом на 1000 (митотический индекс в %) и количество меченых клеток на 1000 клеток с пересчетом на 100 (индекс метки в %). Мечеными считали лишь клетки, содержащие не менее 3 (клетки типа А) или 4 (клетки типа Б) зерен серебра. Статистическую обработку полученных данных производили по методу Фишера — Стьюдента.

Все режимы фракционированного облучения асцитной лимфомы NK/Ly угнетали размножение опухолевых клеток. При ежедневном облу-

чении опухоли снижение числа митозов после последнего (пятого) сеанса наблюдалось уже через 0,5 час. после лучевого воздействия (рис. 1). Минимальное количество митозов при этом режиме было зарегистрировано спустя 3 часа после облучения. Начиная с этого времени происходил подъем митотической активности и через 12 час. митотический индекс восстанавливался до уровня контроля, а к 36 час. превышал таковой примерно в 2 раза. Затем происходило вторичное снижение числа делящихся клеток

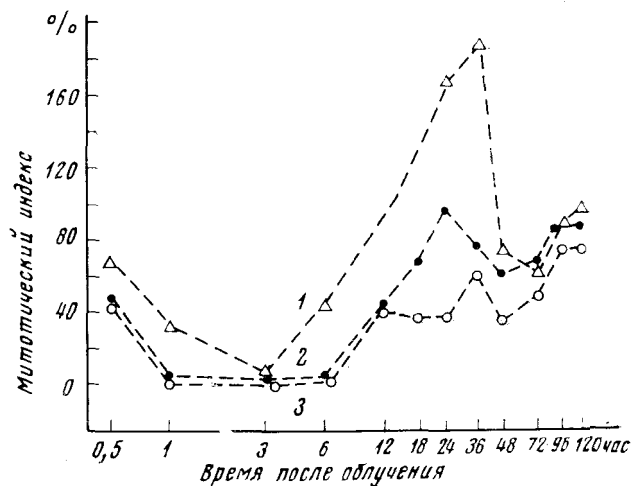


Рис. 1. Изменение митотической активности в асцитной лимфоме НК/Лу после фракционированного облучения быстрыми электронами (полулогарифмическая система координат). 1 — ежедневное облучение (200 рад/5 фракций), 2 — три раза в неделю (333 рад/3 фракции), 3 — два раза в неделю (500 рад/2 фракции)

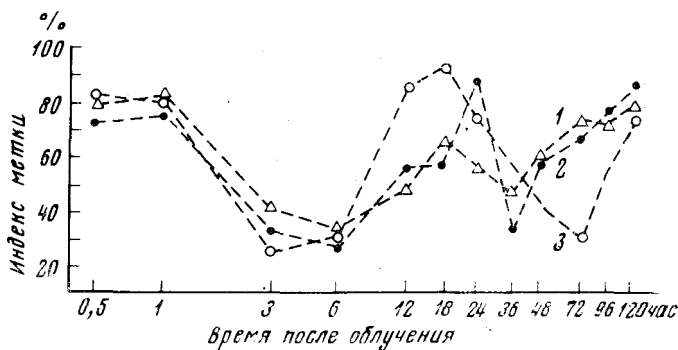


Рис. 2. Изменение числа клеток синтезирующих ДНК в асцитной лимфоме НК/Лу после фракционированного облучения быстрыми электронами (полулогарифмическая система координат). Обозначения те же, что на рис. 1

и к 72 час. митотический индекс составлял 64% по отношению к контролю. После этого снова отмечался подъем митотической активности и к 120 час. количество митозов достигало контрольной величины (рис. 1).

Более выраженное угнетение клеточного деления по сравнению с ежедневным облучением имело место при воздействии на лимфому НК/Лу разовой дозой быстрых электронов 333 рад три раза в неделю. При этом режиме в промежутке времени между 1 и 6 час. после окончания курса облучения в препаратах обнаруживались лишь единичные митозы. Восстановление митотической активности наступало позже и было более медленным, чем при ежедневном облучении. Максимум митозов, наблюдаемый

спустя 24 часа после лучевого воздействия, не превышал уровня контроля. За подъемом митотической активности также, как и при ежедневном облучении, наступало вторичное снижение числа делящихся клеток. При этом степень падения митотического индекса (64% по отношению к контролю) была такой же, как и при ежедневном воздействии. После чего наступало повторное восстановление клеточного размножения и к 120 час. митотический индекс составлял 90% от контрольной величины (рис. 1).

Иная картина наблюдалась при облучении лимфомы НК/Ly разовой дозой 500 рад два раза в неделю. При этом режиме подавление деления опухолевых клеток было значительно сильнее по сравнению с трехкратным и особенно ежедневным облучением. В первые 6 час. после воздействия режимом крупного фракционирования митозы в опухоли совсем не выявлялись. Затем митотический индекс начинал медленно повышаться и спустя 120 час. после облучения количество делящихся клеток в опухоли достигало лишь 73% от таковых в контроле (рис. 1). При этом восстановление клеточной пролиферации происходило медленно и довольно монотонно без периодов снижения и повторного подъема.

При рассмотрении действия взятых нами режимов облучения на пролиферацию клеток лимфомы обращает на себя внимание то, что исчезновение митотической активности клеток происходит за время, меньшее длительности предмитотической фазы G_2 , которая у нашего штамма опухоли длится 4 часа (²). Последнее, судя по однократным облучениям (^{3, 4}), вероятно, связано с тем, что ионизирующее излучение блокирует переход клеток из фазы G_2 в митоз (M). Наблюдаемый при ежедневном облучении довольно быстрый подъем митотического индекса связан с прекращением блока $G_2 \rightarrow M$ и вступлением в митоз одновременно большого количества клеток, которые накопились за время блокирования в фазе G_2 . Вторичное падение митотической активности обусловлено повторным блоком в фазе G_2 , возникшим после прохождения клетками одного деления (⁵⁻⁷). При больших дозах радиации, особенно при разовой дозе 500 рад, блокирование перехода $G_2 \rightarrow M$ продолжается гораздо дольше, причем оно сопровождается гибелью значительной части опухолевых клеток, накапливающихся в фазе G_2 . Этим, по-видимому, можно объяснить медленное восстановление митотической активности при крупном режиме фракционирования.

Для более полного суждения о пролиферативной способности клеток лимфомы после фракционированных облучений важное значение имеют данные о числе ДНК синтезирующих клеток. На рис. 2 представлена динамика изменений индекса меченых клеток после использованных нами режимов лучевого воздействия. При этом видно, что при всех курсах фракционирования дозы электронов в первые шесть часов после облучения происходило постепенное уменьшение индекса метки. Последнее является результатом подавления радиацией синтеза ДНК в опухолевых клетках (⁸⁻¹⁰). Восстановление синтеза ДНК в облученных клетках проявляется увеличением числа ДНК синтезирующих клеток, что имело место и в наших опытах, когда вслед за максимальным снижением индекса метки начиналось повышение количества ДНК синтезирующих клеток. При этом следует отметить, что при режиме среднего и, особенно, крупного фракционирования, возрастание индекса метки происходило заметно интенсивнее по сравнению с курсом ежедневного облучения. Так, при ежедневном режиме через 18—24 часа после облучения индекс метки возрос до 69% от уровня контроля, а при курсах среднего и крупного фракционирования соответственно до 90—95%. После этого наступило вторичное уменьшение числа опухолевых клеток, способных синтезировать ДНК, которое было более выраженным при среднем и крупном фракционировании дозы по сравнению с ежедневным облучением. За этим снижением индекса метки происходило вторичное увеличение процента меченых клеток, которое однако при всех режимах так и не достигло уровня контроля к 120 час. после облучения (см. рис. 2).

Сравнивая динамику изменений митотического индекса и индекса метки, следует отметить, что подавление митозов наступало раньше и более резко, чем снижение числа ДНК синтезирующих клеток. В то же время характер восстановления митотической активности и синтеза ДНК были примерно сходными в течение всего срока наблюдения. Однако при режиме крупного фракционирования увеличение индекса метки происходило более быстрыми темпами, чем подъем числа делящихся клеток. Не исключено, что это явление частично обусловлено более сильным замедлением скорости синтеза ДНК за счет воздействия сравнительно высокой разовой дозы (500 рад) при курсе крупного фракционирования, что могло привести к удлинению периода S и, естественно, к увеличению индекса метки. Последующее снижение числа меченых клеток, по-видимому, вызвано блоком $G_2 \rightarrow M$. В результате этого блока клетки с запозданием проходят все остальные фазы митотического цикла (^{3, 4}).

Подводя итоги по исследованию сравнения влияния разных режимов фракционирования дозы электронов на интенсивность клеточного размножения и способность клеток лимфомы к синтезу ДНК, следует отметить, что несмотря на одинаковые значения суммарных доз и общего времени облучения эффект быстрых электронов был различным. Уменьшение числа фракций с одновременным увеличением разовой дозы приводило к более выраженному торможению митотической активности и синтеза ДНК в опухолевых клетках.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. Л. П. Липчиной и сотрудникам руководимой ею лаборатории за ценные консультации при выполнении настоящего исследования.

Научно-исследовательский институт онкологии
им. П. Н. Петрова
Ленинград

Поступило
31 X 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. П. Козлов, Физико-технические и некоторые радиобиологические аспекты применения мегавольтных излучений в лучевой терапии. Автореф. докт. дисс., М., 1974. ² А. В. Алещенко, Л. П. Липчина, О. С. Франкфурт, Цитология, т. 9 (2), 217 (1967). ³ J. Kim, T. C. Evans, Radiation Res., v. 21, 129 (1964). ⁴ M. Tubiana, Brit. J. Radiol., v. 44 (521), 325 (1971). ⁵ J. E. Till, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 95, 911 (1961). ⁶ W. C. Dewey, R. M. Humphrey, Radiation Res., v. 16, 503 (1962). ⁷ О. С. Франкфурт, Л. П. Липчина, ДАН, т. 154, № 1, 207 (1964). ⁸ S. Mak, J. E. Till, Radiation Res., v. 20, 600 (1963). ⁹ R. M. Holford, Int. J. Rad. Biol., v. 11, 367 (1966). ¹⁰ K. Hempel, Biophysik, v. 4, 356 (1968). ¹¹ G. F. Whitmore et al., Biochem. et biophys. acta, v. 47, 66 (1961).