

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

421/83

12/1-83

19-82-755

Г.Эрцгрeбер, Н.Л.Шмакова,* К.Лангрок

МОДЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПО КОНЦЕПЦИИ NSD
НА МНОГОКЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДАХ

Направлено в журнал "Радиобиология"

* Всесоюзный онкологический научный центр
АМН СССР, Москва

В основе концепции номинальной стандартной дозы (NSD), предложенной Эллисом^{/1/}, лежат клинические данные о воздействии фракционированного облучения на нормальные и опухолевые ткани. Эта эмпирически полученная зависимость между суммарной дозой D, необходимой для достижения определенного биологического эффекта, и числом фракции N за общее время облучения T применяется к редкоизионизирующим излучениям, и для нормальных тканей описывается формулой

$$D = NSD \cdot N^{0,24} \cdot T^{0,11}, \quad /1/$$

а для опухолевых тканей - формулой

$$D = TSD \cdot N^{0,24}, \quad /2/$$

где NSD и TSD /туморозная стандартная доза/ являются константами для выбранной величины эффекта. При использовании в лучевой терапии нейтронов для N предложен показатель степени 0,04^{/2/}.

В данной работе изучалась возможность применения многоклеточных сфероидов /МКС/^{/3/} в качестве модельной системы для исследований по концепции NSD с целью получения сведений, необходимых для использования в лучевой терапии опухолей нестандартных видов излучения.

МКС имеет некоторые общие свойства с солидной опухолью: вследствие недостаточного снабжения питательной средой и кислородом внутри сфероида возникают некротические и гипоксические зоны^{/4/}. Через двое суток после облучения МКС можно регистрировать его повреждение, которое проявляется в виде разрыхления поверхности сфероида из-за лизиса поврежденных клеток. Период клеточной деструкции сменяется периодом восстановления. При дозах до 20 Гр сфероид полностью регенерирует. При более высоких дозах /25-50 Гр/ одиночные выжившие клетки внутри сфероида начинают размножаться, в результате чего на его поверхности образуются быстро увеличивающиеся в размерах выпуклости, которые со временем превращаются в новые сфероиды^{/5/}.

В качестве меры эффекта использовали частоту гибели МКС, которую определяли как отношение числа сфероидов, не регенерировавших после облучения в данной суммарной дозе, к общему числу облученных сфероидов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили клетки китайского хомячка линии V 79-4. В экспериментах использовались суспензии одиночных клеток, полученные из монослойной культуры, и МКС.

Отдельные клетки. Метод определения выживаемости отдельных клеток и способ создания анакисических условий в клеточных суспензиях для определения величины кислородного эффекта описаны ранее /8/.

МКС. Способ культивирования многоклеточных сфероидов описан в /8/. Для облучения в разных дозах использовались по 10 сфероидов со средним диаметров 500 ± 50 мкм. Каждые 1-2 дня в течение 25 дней после облучения под микроскопом измерялись диаметры сфероидов и регистрировалось наличие регенерации, о чем судили по появлению выпуклостей на их поверхности.

Облучение. Для облучения γ -лучами ^{137}Cs использовалась установка "Свет" с мощностью дозы $4,66$ Гр/мин. Облучение нейтронами со средней энергией $\bar{E}=0,7$ МэВ и мощностью дозы $2 \cdot 10^{-2}$ Гр/мин. осуществлялось на импульсном реакторе ИБР-30 в ОИЯИ /7/. Клеточные суспензии облучались при температуре $17-20^\circ\text{C}$, МКС облучались при 37°C , во избежание реоксигенации гипоксических клеток вследствие уменьшения ими потребления кислорода при пониженной температуре /8/.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

По критерию выживаемости отдельных клеток относительная биологическая эффективность /ОБЭ/ нейтронов по сравнению с γ -лучами равна $4,9$, а величина кислородного эффекта /КЭ/ для нейтронов $-1,4$, для γ -лучей $-2,7$ /рис.1/.

При облучении МКС диапазон используемых доз был определен исходя из полученной на отдельных клетках величины ОБЭ нейтронов. На рис.2 приведены кривые роста МКС после однократного γ - и нейтронного облучения в разных дозах. Номерами у кривых отмечено число сфероидов из 10 облученных в данной дозе, которые полностью регенерируют или регенерация которых проявляется в виде локального роста. Пунктирными линиями обозначены периоды времени после облучения, когда измерение диаметра МКС затруднено из-за нарушения поверхности вследствие лизиса клеток.

Зависимость частоты гибели МКС от дозы облучения описывается сигмоидной кривой /рис.3а/. Такую же форму имеет кривая зависимости от дозы облучения вероятности излечения опухолей /9/. ОБЭ нейтронов по критерию 50% частоты гибели МКС равна 10.

В таблице представлены полученные нами величины ОБЭ и КЭ для γ -лучей и нейтронов по критерию выживаемости отдельных клеток, клеток из облученных МКС и по частоте гибели МКС. В таблице также включены значения ОБЭ и КЭ для нейтронов со средней энергией $\bar{E}=6,2$ МэВ и для рентгеновых лучей, взятые из литературы /10,11/. Показанное нами повышение ОБЭ нейтронов с $\bar{E}=0,7$ МэВ по сравнению с нейтронами с $\bar{E}=6,2$ МэВ находится в соответствии с данными, полученными также на клетках китайского хомячка линии V 79-4 /12/. При переходе от нормальных условий к анакси-

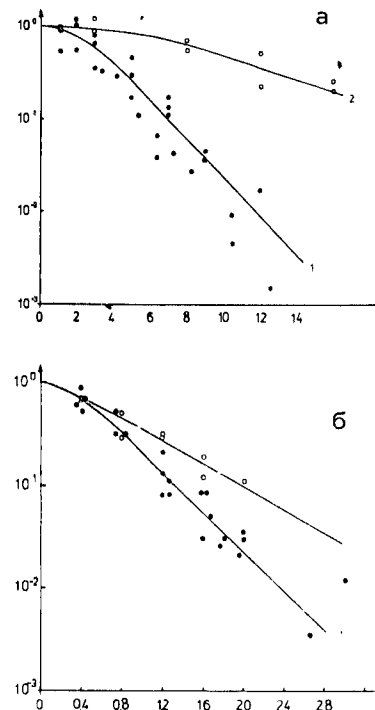


Рис.1. Кривые выживаемости отдельных клеток китайского хомячка линии V 79-4 при облучении γ -лучами /а/ и нейтронами $\bar{E}=0,7$ МэВ /б/ в обычных /кривые 1/ и анакисических /кривые 2/ условиях. По оси абсцисс - доза Гр; по оси ординат - доля выживших клеток.

ческим наблюдается значительное увеличение ОБЭ нейтронов. Сопоставление по разным критериям величин ОБЭ, полученных для нейтронов с $\bar{E}=0,7$ МэВ и $\bar{E}=6,2$ МэВ, позволяет предположить, что выживаемость облученных МКС обусловлена выживаемостью содержащихся в них гипоксических клеток.

На рис.3б показана зависимость частоты гибели МКС от суммарной дозы фракционированного γ - и нейтронного облучения. Пунктирной линией обозначена кривая, полученная при однократном облучении /рис.3а/. Большая крутизна кривых для фракционированного облучения /при $N=5$ наклон $5,3 \cdot 10^{-4}$ /рад/ по сравнению с однократным /наклон $3,5 \cdot 10^{-4}$ /рад/ свидетельствует о том, что при фракционировании дозы между отдельными фракциями происходит реоксигенация гипоксических клеток, вследствие чего они становятся более радиочувствительными /13/. При нейтронном облучении эффект реоксигенации не обнаруживается из-за низкой величины КЭ нейтронов.

Для оценки влияния общего времени облучения T на частоту гибели МКС одинаковые суммарные дозы, раздробленные на 5 фракций, были даны за разное время - 5 и 15 дней /рис.3б/. Если бы было справедливо уравнение /1/, то частоте гибели МКС $0,5$ при $T=15$ дней соответствовала бы суммарная доза 52 Гр. Однако, как видно из рис.3б, такого влияния T на гибель МКС не обнаружено. Таким образом, реакция МКС на облучение не зависит от T и описывается уравнением /2/, характеризующим реакцию на облучение опухолей.

На рис.4 приведены изозэффектные кривые, отражающие зависимость суммарной дозы облучения от количества фракций по критерию 50% частоты гибели МКС и излечения опухолей для разных видов излучений. Кривые построены на основании наших /рис.3б/

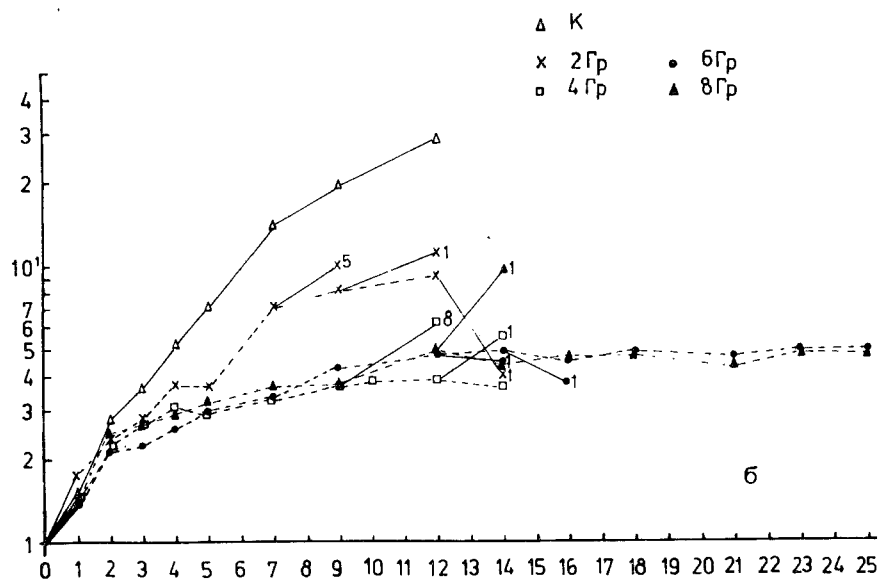
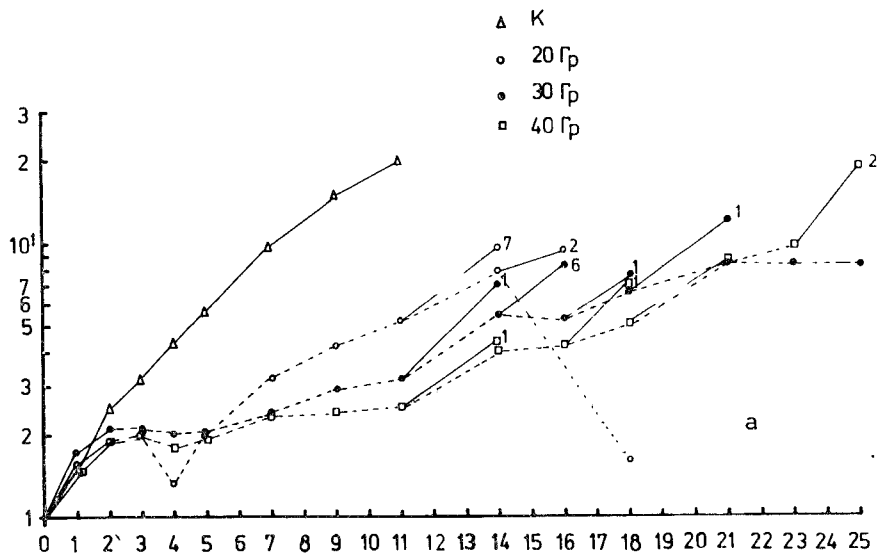


Рис.2. Кривые роста МКС после однократного облучения γ -лучами /а/ и нейтронами с $E = 0,7$ МэВ /б/. По оси абсцисс - продолжительность инкубации /дни/; по оси ординат - отношение объема сфероидов в момент наблюдения к объему в момент облучения (V/V_0).

Таблица
Значения относительной биологической эффективности /ОБЭ/ и кислородного эффекта /КЭ/ для нейтронов, рентгеновых и γ -лучей по различным критериям

Вид излучения	КЭ		ОБЭ		Источ-ник
	Отдельные клетки, выживаемость 0,01	Отдельные клетки, выживаемость 0,01	Клетки из облученных МКС, выживаемость 0,01	Частота гибели МКС 0,5	
Рентген. лучи	3,0	1,0	1,0	1,0	/10,11/ собств. данные
γ -лучи ^{137}Cs	2,7	1,0	1,0	1,0	/10,11/ собств. данные
Нейтроны (6,2 МэВ)	1,7	оксиге-аноксигенные 2,8	4,9	5,0	/10,11/ собств. данные
Нейтроны (0,7 МэВ)	1,4	4,9	-	10,0	

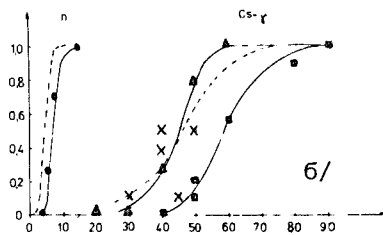
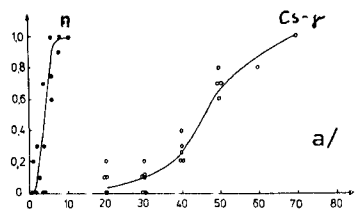


Рис.3. Частота гибели МКС после однократного /а/ и фракционированного /б/ облучения γ -лучами и нейтронами с $\bar{E}=0,7$ МэВ. Нейтроны - $N=5$, $T=5$ сут. - темные кружки, γ -лучи - $N=5$, $T=15$ сут. - крестики, $N=5$, $T=5$ сут. - треугольники, $N=10$, $T=10$ сут. - квадраты /б/. По оси абсцисс - доза, /Гр/; по оси ординат - частота гибели МКС.

и литературных /13-16/ данных. Наклон изоэффективных кривых соответствует показателю степени N в уравнении /2/. По нашим данным, величина показателя степени N для γ -излучения равна

$0,38 \pm 0,14$, что достаточно хорошо совпадает с величиной, имеющейся в литературе /13-17/. Для количественной оценки показателя степени N при облучении нейтронами пока недостаточно экспериментальных данных. Тем не менее, имеющиеся результаты позволяют сделать заключение о более низком значении показателя степени N для нейтронов по сравнению с γ -лучами.

Как уже указывалось, цель работы состояла в изучении целесообразности применения МКС в исследованиях по концепции NSD. В результате проведенных экспериментов получены сигмоидные кривые зависимости частоты гибели МКС от суммарной дозы облучения, показан эффект реоксигенации при фракционированном облучении МКС, показано удовлетворительное соответствие показания степени N для гибели МКС и излечения опухолей /по клиническим данным/, а также отсутствие зависимости в реакции сфероидов на облучение от общего времени облучения. Все это позволяет прийти к заключению, что МКС, являясь моделью опухоли, могут служить объектом для исследований по концепции NSD. Сравнительно несложное культивирование этого объекта, возможность получения МКС разных размеров из клеток различных линий делают эксперименты на МКС рациональным дополнением к исследованиям, проводимым на животных.

Авторы выражают благодарность В.М.Назарову за предоставление возможности облучений и проведения дозиметрических измерений на ИБР-30, а также А.Круг, М.Лаукнер и Б.Рихтер за техническую помощь в работе.

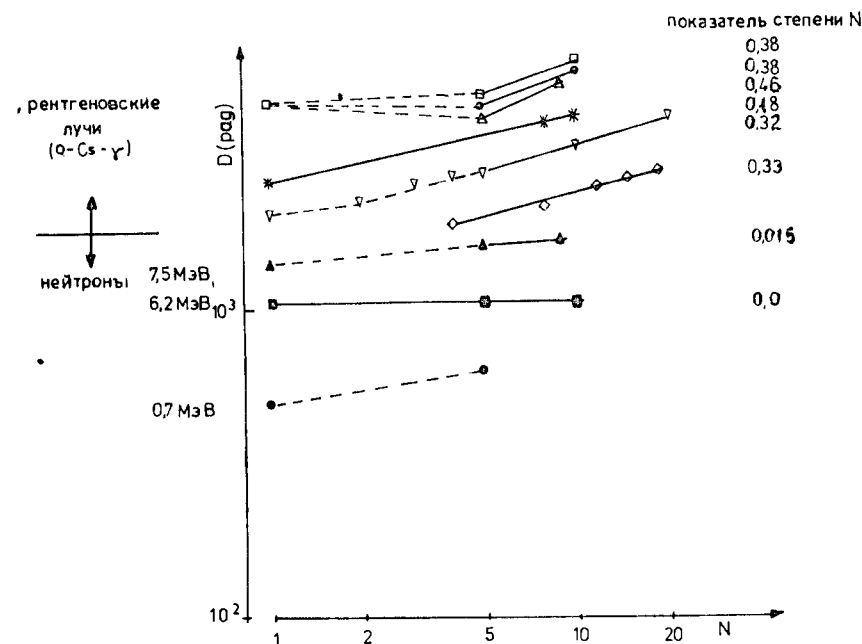


Рис.4. Изоэффективные кривые зависимости суммарной дозы облучения от числа фракций для частоты гибели МКС и вероятности излечения опухолей 0,5. МКС 500 мкм: γ -лучи - светлые кружки; нейтроны с $\bar{E}=0,7$ МэВ - темные кружки, рентгеновы лучи /18/ - светлые квадраты, нейтроны с $\bar{E}=6,2$ МэВ /18/ - темные квадраты. МКС 50 мкм /14/: рентгеновы лучи - звездочки. Карцинома молочной железы /15/: рентгеновы лучи - светлые треугольники, нейтроны с $\bar{E}=7,5$ МэВ - темные треугольники. Болезнь Хочкина: рентгеновы лучи - перевернутые треугольники. По оси абсцисс - число фракций, по оси ординат - суммарная доза для эффекта 0,5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ellis F. Clin.Radiol., 1969, 1, p. 1.
2. Field S.B., Brit J. Radiol., 1971, 45, p. 315.
3. Kopp J. Studia biophysica, 1978, 68, p. 159.
4. Kopp J. Studia biophysica, 1978, 70, p. 161.
5. Kopp J. Studia biophysica, 1978, 71, p. 207.
6. Вайнсон А.А. и др. Радиобиология, 1977, 17, с. 874.

7. Комова О.В., Назаров В.М. и др. В кн: 3-е совещание по использованию новых ядерно-физических методов для решения научно-технических и народнохозяйственных задач, с. 282, ОИЯИ, P18-12147, Дубна, 1979.
8. Sutherland R.M., Durant R.E., Internat. J. Radiat. Biol., 1973, 23, p. 235.
9. Trott K.-H. Strahlentherapie, 1974, 148, p. 451.
10. Tolkendorf E. Studia biophysica, 1978, 73, p. 91.
11. Tolkendorf E. Studia biophysica, 1978, 73, p. 93.
12. Hall E.J. et al. Rad. Research, 1975, 64, p. 245.
13. Ellis F., Brit J. Radiology, 1971, 44, p. 101.
14. Durand R.E. Rad. Research, 1980, 81, p. 85.
15. Fowler J.E. Brit J. Radiology, 1972, 45, p. 237.
16. Tolkendorf E. Studia biophysica, 1982, 88, p. 55.
17. Fowler J.F., Brit. J. Radiology, 1971, 44, p. 81.

Рукопись поступила в издательский отдел
1 ноября 1982 года.

Эрцгребер Г., Шмакова Н.Л., Лангрок К. 19-82-755
Модельные исследования по концепции NSD на многоклеточных сфероидах

Изучалась возможность применения многоклеточных сфероидов в качестве модельной системы для исследований по концепции NSD. Показана зависимость частоты гибели сфероидов из клеток китайского хомячка V 79-4 от суммарной дозы облучения γ -лучами и нейтронами $E_n = 0,7$ МэВ /число фракций - 1,5,10/; описан эффект реоксигенации при фракционированном облучении сфероидов. Получено хорошее совпадение показателя степени N для многоклеточных сфероидов и клинических данных.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1982

Ergräber G., Shmakova N.L., Langrok K. 19-82-755
Model Investigations to the NSD Concept with Multicellular Spheroidy

A possibility of using cell spheroids as a model system for investigations to the NSD concept was tested with the aim to obtain practically useful orientation at non-confessional radiations. The spheroid control probability in the dependence of summary dose (number of fractions N=1, 5, 10) after irradiation of spheroids of Chinese hamster cells V 79-4 with γ -rays and neutrons ($E_n = 0.7$ MeV) was studied. There was demonstrated the reoxygenation effect after fractionated irradiation and obtained a good agreement of the experimental results with spheroids and clinical trials relative to the NSD concept.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1982

Перевод О.С.Виноградовой.