

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

3400/83

22/6-83

19-83-257

Н.Л.Шмакова*, К.Лазэр, Г.С.Ушанова,
Т.А.Фадеева *

ПРОБЛЕМА

УСИЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ.

ГЛЮКОЗА КАК СРЕДСТВО ПОВЫШЕНИЯ
РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК
АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА *in vitro*

Направлено в журнал "Радиобиология"

* Всесоюзный онкологический научный центр
АМН СССР, Москва.

1983

Гипергликемия как фактор, избирательно усиливающий противоопухолевое действие ионизирующих излучений, уже нашла клиническое применение^{/1,2/}. В последнее время была показана эффективность кратковременной /2,5 ч/ гипергликемии, применяемой как до облучения, так и после него^{/3/}.

Однако многие вопросы механизма действия гипергликемии неизучены. В частности, остается невыясненной относительная роль клеточного фактора и влияния организма на наблюдаемое в условиях *in vivo* усиление противоопухолевого действия излучения. Выяснение этих вопросов, кроме их фундаментального значения, представляет непосредственный практический интерес в плане оптимизации условий применения гипергликемии с целью повышения эффективности лучевой терапии опухолей.

Настоящая статья является первой в цикле работ, посвященных выяснению клеточного компонента в механизме действия гипергликемии *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В экспериментах использовали клетки асцитной карциномы Эрлиха линии ELD, которую поддерживали на мышах F₁ (СВА × С₅₇ В) путем внутрибрюшинной прививки 1 раз в 7 дней 0,1 мл асцитной жидкости. На 7- 8-й день после прививки асцитные клетки извлекали из брюшной полости мышей, отмывали от асцитной жидкости путем центрифугирования и готовили клеточную суспензию, содержащую $50 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл физиологического раствора или среды 199. Такая высокая концентрация клеток была использована с целью создания благоприятных условий для интенсивного анаэробного гликолиза. Суспензию разливали по 3 мл в пенициллиновые флаконы и инкубировали при 37°C в течение 1 ч без перемешивания. К половине проб добавляли глюкозу из расчета 8 мг на 1 мл среды. Конечная концентрация глюкозы в суспензиях приведена в табл.1: После инкубации клетки перемешивали и измеряли рН суспензии с помощью рН-метра-милливольтметра рН-121. Инкубацию клеток в физиологическом растворе использовали для оценки интенсивности гликолиза /по изменению рН /, поскольку присутствующий в среде 199 буфер нейтрализует образующийся лактат.

Через 20 мин после окончания инкубации клетки, содержащиеся в среде 199 при комнатной температуре, подвергали воздействию гамма-лучей ¹³⁷Cs в дозе 30 Гр при мощности дозы 4,6 Гр/мин.

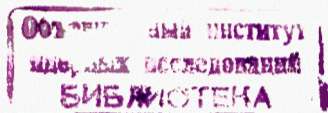


Таблица 1

Изменение pH после инкубации клеток асцитной карциномы Эрлиха в течение 1 ч в разных условиях

Условия инкубации	Среда 199		Физиологический раствор	
	1 мг глюкозы в 1 мл	8 мг глюкозы в 1 мл	без глюкозы	8 мг глюкозы в 1 мл
№ опыта				
1	6,7→6,5	6,7→5,7	6,3→6,5	6,3→4,9
2	7,1→6,6	7,1→6,2	6,9→6,8	6,9→5,2
3	6,8→6,6	6,8→6,1	-	-
4	-	-	6,8→6,7	6,8→5,3
Средние значения pH	0,3±0,13	0,87±0,13	0±0,13	1,5±0,13

Концентрированные клеточные суспензии разбавляли средой до требуемых концентраций. Мышам-реципиентам F₁ (СВА×С₅₇Вl), предварительно облученным в дозе 3 Гр, вводили 10⁶ клеток в объеме 0,1 мл внутривенно /10-15 мышам/ или 1,25·10⁵ клеток в объеме 0,05 мл под кожу передних и задних конечностей /3-4 мышам/. Чтобы избежать ошибок, связанных с влиянием на рост опухолей погибших клеток /4/, к каждой из вводимых суспензий добавляли облученные в дозе 300 Гр /при мощности дозы 43 Гр/мин/ клетки асцитной карциномы Эрлиха в таком числе, чтобы их количество в каждом инокуляте равнялось 10⁶. Определяли процент прививаемости опухолей, а также латентный период появления солидных опухолей и среднюю продолжительность жизни погибших мышей с асцитными опухолями.

Животные с асцитными опухолями были под наблюдением в течение трех месяцев, с солидными - в течение одного месяца, так как позже этого срока солидные опухоли, как правило, не развивались.

В каждом опыте было четыре экспериментальные группы: две контрольные /инкубация в среде без добавления глюкозы и с ее избытком/ и две опытные /инкубация и облучение в среде без добавления глюкозы и с ее избытком/.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При инкубации клеток асцитной карциномы Эрлиха в физиологическом растворе и среде 199 с избытком глюкозы наблюдалось значи-

тельное падение pH: в физиологическом растворе - на 1,3-1,7, в среде 199 - на 0,7-1; это свидетельствовало о высокой интенсивности гликолитических процессов в клетках в данных условиях /табл.1/. Различия в величинах pH в физиологическом растворе и среде, как уже отмечалось, связаны с буферными свойствами последней. Поскольку среда 199 содержит небольшое количество глюкозы /1 мг/мл/, в ней также происходит слабое закисление суспензии.

В табл.2 приведены результаты семи опытов по изучению влияния облучения клеток асцитной карциномы Эрлиха в нормальных условиях /среда 199/ и в условиях избыточного содержания глюкозы на их способность образовывать опухоль в асцитной и солидной формах. Видно, что при облучении опухолевых клеток в среде, содержащей 9 мг/мл глюкозы, в шести опытах значительно снижается процент привившихся асцитных опухолей и в четырех опытах - процент привившихся солидных опухолей по сравнению с облучением в среде без добавления глюкозы. В среднем процент привившихся асцитных опухолей снизился с 87,6% до 39,7%, солидных - со 100% до 58,7%. Одновременно со снижением процента прививаемости опухолей во всех семи опытах при облучении клеток в среде с повышенным содержанием глюкозы наблюдалось увеличение латентного периода появления солидных опухолей и продолжительности жизни мышей-реципиентов с асцитными опухолями.

Очевидно, что все эти эффекты связаны с уменьшением числа выживших клеток, содержащихся в суспензиях, инкубированных перед облучением с глюкозой. Для ориентировочной оценки снижения жизнеспособности клеток, облученных в условиях повышенного содержания глюкозы, нами были получены кривые зависимости латентного периода появления солидных опухолей и продолжительности жизни мышей с асцитными опухолями от количества привитых интактных опухолевых клеток /см. рисунок/; соответствующие средние значения из табл.2 были сопоставлены с этими кривыми.

Облучение в условиях избыточного содержания глюкозы уменьшает фракцию выживших клеток по сравнению с облучением в обычных условиях по первому критерию /рис.А/ в среднем в 150 раз, по второму критерию /рис.Б/ - в 250 раз. Как видно из рисунка, величина эффекта колеблется в довольно широких пределах. С нашей точки зрения этому может быть дано следующее объяснение. При анализе табл.2 обращает на себя внимание тот факт, что вариабельность данных в контрольной группе существенно ниже, чем во всех остальных экспериментальных группах. Это свидетельствует о том, что высокая вариабельность в величинах латентного периода появления солидных опухолей, продолжительности жизни мышей с асцитными опухолями и процента прививаемости опухолей в опытных группах обусловлена не случайными статистическими разбросами, а связана с разной исходной радиочувствительностью опухолевых клеток и их разной реакцией на дополнительное воздействие глюкозой.

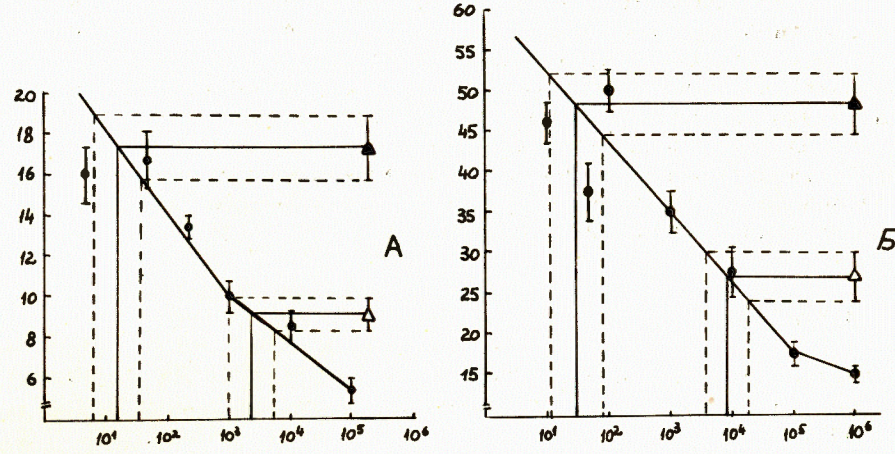
Таким образом, снижение pH на 0,4 в клеточных суспензиях, инкубированных с избытком глюкозы, по сравнению с инкубацией

Таблица 2

Модификация радиочувствительности клеток карциномы Эрлиха при их однокласовой инкубации в среде, содержащей избыток глюкозы

№ опыта	Солевая форма				Асцитная форма				Именитые рН (▲ рН) в суспензии									
	Контроль гликоза		30 Гр		Контроль гликоза		30 Гр		Контроль гликоза		30 Гр + гликоза							
	СЛП сутки	СЛП сутки	СЛП сутки	СЛП сутки	СЛП сутки	СЛП сутки	СЛП сутки	СЛП сутки	СЛП сутки	СЛП сутки	СЛП сутки	СЛП сутки						
1	4,1±0,26	100	6,6±0,58	100	11,3±1,1	100	29	12	17±0,01	100	28±2	75	40,5±1,2	28	>90	0	0,3	1,0
2	4,2±0,65	100	5,9±0,52	100	6,6±0,65	100	9,8±0,78	100	18,2±0,48	100	17,4±0,65	100	22±0,3	100	44,6±3,3	83	0,25	0,6
3	4,2±0,26	100	5,3±0,65	100	7,1±0,65	100	13,2±2,1	100	16±0,6	100	21,8±0,54	100	33,4±2,7	93	59	7	0,65	1,05
4	5,8±0,52	100	7,3±0,78	100	6±0,6	100	17,3±3	100	16±0,5	100	17,9±0,65	100	19,8±0,16	100	40±2,7	100	0,15	0,55
5	5,3±0,4	100	6,1±0,4	100	9,1±0,78	100	16,5±1,4	50	16,5±0,45	100	18,3±0,6	100	28,8±2,1	92	47,5±7,5	28	0,8	0,85
6	3,6±0,5	100	4,1±0,5	100	10,3±0,7	100	16±3,8	37	17,7±0,45	100	20,1±0,75	100	23,8±1,5	100	56	7	0,6	1,1
7	5,1±0,65	100	6,1±0,65	100	11,8±0,4	100	20	12	16,8±0,6	100	18±0,8	100	21,3±0,1	100	46,5±5,3	53	0,2	0,6
Средние значения	4,6±0,33	100	5,9±0,5	100	9,2±0,8	100	17,4±2,88	58	16,7±1,3	100	20,2±1,6	98	44±3,8	87,6±11	47,9±3,4	39,7±15	0,42±0,09	0,82±0,08
КВ % 4)	5,4	0	8,4	0	8,6	0	17	22	1,8	0	7,9	3,9	11,5	12	7	38	21	9,7

- 1/ СЛП - средний латентный период;
 2/ П - прививаемость;
 3/ СЛЖ - средняя продолжительность жизни;
 4/ КВ - коэффициент вариабельности.



Зависимость латентного периода появления солидных опухолей /А/ и продолжительности жизни мышей с асцитными опухолями /Б/ от количества введенных интактных опухолевых клеток. По оси абсцисс - число привитых клеток /в логарифмическом масштабе/, по оси ординат - латентный период появления опухолей и продолжительность жизни мышей, в сутках. Треугольниками нанесены средние значения латентного периода появления солидных опухолей и продолжительности жизни мышей /см. табл. 2/; светлые треугольники - 30 Гр; темные - 30 Гр + глюкоза.

в среде без добавления глюкозы, при котором имеет место очень незначительное изменение скорости роста опухолей в контрольной группе, при облучении в дозе 30 Гр сопровождалось уменьшением числа жизнеспособных клеток на два порядка. Однако можно предположить, что в действительности на поверхности клеток по время инкубации без перемешивания, падение рН было несколько большим, чем то, которое мы регистрировали в суспензиях. Это предположение находит подтверждение в работе^{/5/}, в которой по соотношению рН в супернатанте и в суспензии после перемешивания было рассчитано, что при однокласовой инкубации $5 \cdot 10^7$ клеток асцитного рака Эрлиха в 1 мл физиологического раствора рН на поверхности клеток примерно на 0,75-1 ниже, чем в суспензии.

Полученные нами результаты находятся в соответствии с данными статьи^{/6/} - единственной известной нам работы, в которой было показано усиление эффекта облучения опухолевых клеток путем предварительной их инкубации с глюкозой in vitro. Однако из этой работы неясны условия инкубации и отсутствует количественная оценка эффекта, что затрудняет сопоставление наших результатов с данными указанных авторов.

Итак, эксперименты показали, что одночасовая инкубация клеток асцитной карциномы Эрлиха с избытком глюкозы сама по себе лишь незначительно сказывается на длительности латентного периода появления солидных опухолей и продолжительности жизни мышей с асцитными опухолями, однако резко усиливает летальное действие облучения, что проявляется в уменьшении числа привившихся опухолей, существенным увеличением продолжительности жизни животных с развившимися асцитными опухолями и длительности латентного периода появления солидных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров Н.Н. и др. Применение гипертермии и гипергликемии при лечении злокачественных опухолей. "Медицина", М., 1980.
2. Ardenne M., von Rietnauer P.G. Acta Biol.Med.Germ., 1970, 25, p.483.
3. Ярмоненко С.П. и др. Мед.радиология, 1981, 26, с.46.
4. Hill R.P. Brit.J.Cancer, 1980, 41, suppl.IV, p.230.
5. Sahler K.P. Gann, 1969, 60, p.657.
6. Dinescu G. et al. Oncologia si Radiologia, 1971, 10, p.437.

Рукопись поступила в издательский отдел
20 апреля 1983 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

ДЗ-11787	Труды III Международной школы по нейтронной физике. Алушта, 1978.	3 р. 00 к.
Д13-11807	Труды III Международного совещания по пропорциональным и дрейфовым камерам. Дубна, 1978.	6 р. 00 к.
Д1,2-12036	Труды VI Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1978 /2 тома/	7 р. 40 к.
Д1,2-12450	Труды V Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1978	5 р. 00 к.
Д1,2-12450	Труды XII Международной школы молодых ученых по физике высоких энергий. Приморско, НРБ, 1978.	3 р. 00 к.
Д11-80-13	Труды VII Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц, Дубна, 1980 /2 тома/	8 р. 00 к.
Д4-80-271	Труды рабочего совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике, Дубна, 1979	3 р. 50 к.
Д4-80-385	Труды Международной конференции по проблемам нескольких тел в ядерной физике. Дубна, 1979.	3 р. 00 к.
Д4-80-385	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1980.	5 р. 00 к.
Д2-81-543	Труды VI Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1981	2 р. 50 к.
Д10,11-81-622	Труды Международного совещания по проблемам математического моделирования в ядерно-физических исследованиях. Дубна, 1980	2 р. 50 к.
Д1,2-81-728	Труды VI Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 60 к.
Д17-81-758	Труды II Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1981.	5 р. 40 к.
Д1,2-82-27	Труды Международного симпозиума по поляризационным явлениям в физике высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 20 к.
Р18-82-117	Труды IV совещания по использованию новых ядерно-физических методов для решения научно-технических и народнохозяйственных задач. Дубна, 1981.	3 р. 80 к.
Д2-82-568	Труды совещания по исследованиям в области релятивистской ядерной физики. Дубна, 1982.	1 р. 75 к.
Д9-82-664	Труды совещания по коллективным методам ускорения. Дубна, 1982.	3 р. 30 к.
ДЗ,4-82-704	Труды IV Международной школы по нейтронной физике. Дубна, 1982.	5 р. 00 к.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу:
101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79
Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований

**ТЕМАТИЧЕСКИЕ КАТЕГОРИИ ПУБЛИКАЦИЙ
ОБЪЕДИНЕННОГО ИНСТИТУТА ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

Индекс	Тематика
1.	Экспериментальная физика высоких энергий
2.	Теоретическая физика высоких энергий
3.	Экспериментальная нейтронная физика
4.	Теоретическая физика низких энергий
5.	Математика
6.	Ядерная спектроскопия и радиохимия
7.	Физика тяжелых ионов
8.	Криогеника
9.	Ускорители
10.	Автоматизация обработки экспериментальных данных
11.	Вычислительная математика и техника
12.	Химия
13.	Техника физического эксперимента
14.	Исследования твердых тел и жидкостей ядерными методами
15.	Экспериментальная физика ядерных реакций при низких энергиях
16.	Дозиметрия и физика защиты
17.	Теория конденсированного состояния
18.	Использование результатов и методов фундаментальных физических исследований в смежных областях науки и техники
19.	Биофизика

Шмакова Н.Л. и др.

19-83-257

Проблема усиления биологического действия ионизирующих излучений. Глюкоза как средство повышения радиочувствительности клеток асцитной карциномы Эрлиха *in vitro*

Изучалось влияние кратковременной инкубации клеток асцитной карциномы Эрлиха в среде, содержащей избыток глюкозы, на их радиочувствительность по критерию роста опухолей в асцитной и солидной формах. Показано, что инкубация клеток с глюкозой, сопровождающаяся изменением pH суспензии, сама по себе вызывает лишь небольшое увеличение длительности латентного периода появления солидных опухолей и продолжительности жизни мышей с асцитными опухолями, однако значительно усиливает летальное действие облучения по указанным критериям, а также по проценту прививаемости опухолей.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1983

Shmakova N.L. et al.

19-83-257

Problem of Enhancement of Ionizing Radiations Biological. Glucose as Means of Increasing the Radiosensitivity of Ehrlich Ascite Tumor Cells *in vitro*

The effect of short-time incubation of Ehrlich ascite tumor cells in medium containing the excess of glucose on their radiosensitivity over the development of ascites and solid tumors was studied. The study has revealed that incubation of cells with glucose is accompanied by the change in pH suspension and induced only a low increase in latent period of development of solid tumors and in surviving time of mice with ascite tumors. However, it increases sufficiently the lethal effect of irradiation over these criteria, as well as over the percent of tumor transplantability.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1983

Перевод О.С.Виноградовой.