

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-84-537

С.П.Ярмоненко,* Н.Л.Шмакова,*
К.Лазэр, В.И.Корогодин

РОЛЬ ГИПОКСИИ
В ДЕЙСТВИИ ГЛЮКОЗНОЙ НАГРУЗКИ
НА ОБЛУЧЕННЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Направлено в журнал "Радиобиология"

*Всесоюзный онкологический научный центр
АМИ СССР, Москва

1984

Гипергликемия, создаваемая до или после воздействия ионизирующими излучениями на животных с привитыми опухолями, избирательно усиливает их повреждаемость, не влияя на лучевое поражение нормальных тканей ^{1,2/}. Это определяет перспективность применения гипергликемии в клинике с целью повышения эффективности лучевой терапии рака. Очевидно, однако, что успехи в практическом применении этого метода обуславливаются знанием лежащих в его основе закономерностей и механизмов. Возможность комбинированного воздействия облучением и избытком глюкозы на опухолевые клетки вне организма ^{3,4/} открывает путь для экспериментального изучения этих закономерностей и механизмов.

В предварительных опытах нами было установлено, что эффективность облучения опухолевых клеток при избытке глюкозы определяется условиями аэрации: если клетки находятся в гипоксии, то избыток глюкозы значительно усиливает их поражаемость, тогда как при нормальной аэрации усиление последствий облучения выражено слабо. Этот феномен допускал два разных объяснения: или инкубация с глюкозой усиливает повреждаемость клеток, облученных в условиях гипоксии, или гипоксия, защищая клетки от облучения, независимо от этого способствует повреждающему действию на них глюкозной нагрузки. Результаты опытов, приводимые ниже, свидетельствуют в пользу второго объяснения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ

В работе использовали клетки асцитной карциномы Эрлиха /АКЭ, линия ELD/, которые способны *in vitro* активно утилизировать глюкозу. Подробности методики постановки опытов описаны ранее ^{1/4/}.

Условия гипоксии создавали путем инкубации суспензии, содержащей около 10^7 опухолевых клеток в 1 мл физраствора, в герметично закрытых пенициллиновых флаконах, а условия оксигенации - путем инкубации таких же клеточных суспензий в виде тонкого слоя /около 3 мм/ в плоскодонных колбах при продувании газовой смесью, содержащей 50% кислорода. В зависимости от схемы опытов глюкозу добавляли или во флаконы, или в колбы, до концентрации 8 мг/мл, не нарушая условий аэрации. Клетки с глюкозой инкубировали перед облучением при 37°C в течение 60 мин., затем, не удаляя глюкозу, облучали гамма-лучами ¹³⁷Cs на установке "Свет" /мощность дозы 4,6 Гр/мин/. Контролем служили клетки, подвергавшиеся таким же воздействиям за исключением глюкозной нагрузки.

Значения pH клеточных суспензий /исходных и после инкубации с глюкозой/ измеряли с помощью pH-метра-милливольтметра pH-121. В исходных суспензиях величина pH варьировала от 6,6 до 6,9; после инкубации с глюкозой в условиях нормальной аэрации pH уменьшалось до 5,6, а в условиях гипоксии - до 5,3-5,0.

Эффективность облучения в комбинации с глюкозной нагрузкой или без нее определялась следующим образом. По 0,5 мл суспензии /т.е. по $5 \cdot 10^6$ клеток/ вводили внутрибрюшинно 10-12 мышам-реципиентам /F₁ от скрещивания CBAxС57BL/, которых предварительно облучали в дозе 3 Гр для подавления иммунитета. Затем в течение двух месяцев учитывали гибель мышей-реципиентов в результате образования опухолей /необлученные опухолевые клетки, введенные мышам в таком количестве, вызывают образование опухолей и гибель 100% животных/. Ранее проведенные специальные опыты показали, что процент погибающих от асцита мышей уменьшается с уменьшением количества вводимых опухолевых клеток или с увеличением дозы их облучения^{/4/}. Следовательно, чем меньше погибает мышей с привитыми опухолевыми клетками, тем меньше жизнеспособность этих клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Опыты ставили по следующей схеме. Свежеизвлеченные из брюшной полости мыш-донора асцитные клетки инкубировали в течение 60 мин с глюкозой или без нее в условиях нормальной аэрации или в условиях гипоксии. После этого клетки облучали в требуемых дозах либо в условиях нормальной аэрации, либо в условиях гипоксии. Когда инкубацию с глюкозой проводили в условиях гипоксии, а облучение - при нормальной аэрации, смену режимов аэрации осуществляли за 5-10 мин до облучения. В том единственном опыте, когда облучение проводили в гипоксии, а инкубацию с глюкозой - при нормальной аэрации, облучение предшествовало глюкозной нагрузке; известно, однако, что эффективность комбинированных воздействий на опухолевые клетки глюкозой и облучением мало зависит от их последовательности^{/2/}. Таким образом, всего было восемь вариантов опытов, которые проводили, за одним исключением, в трех независимых повторностях.

На рис.1 в качестве примера приведены результаты трех таких опытов. По оси абсцисс здесь отложены дозы облучения опухолевых клеток, а по оси ординат - процент погибших в течение двух месяцев мышей-реципиентов. Построенные по экспериментальным точкам кривые, описывающие зависимость гибели мышей от дозы облучения привитых им клеток, позволяют рассчитывать TLD₅₀ - такие дозы облучения опухолевых клеток, которые уменьшают гибель мышей-реципиентов со 100% до 50%. В предварительных опытах было установлено, что кривые доза-эффект, примеры которых приведены на рис.1, при изменении жизнеспособности или радиочувстви-

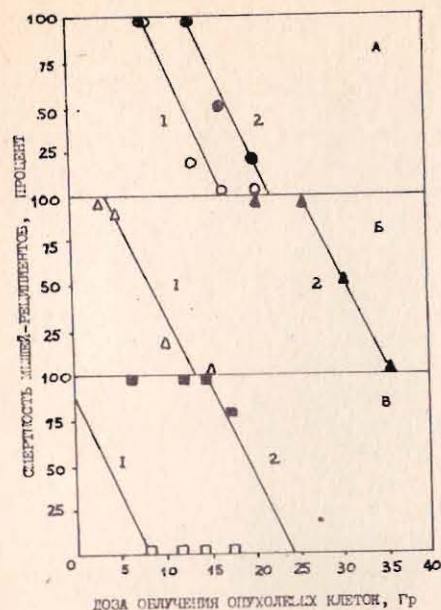


Рис.1. Зависимость смертности мышей-реципиентов от дозы облучения опухолевых клеток. А - глюкозная нагрузка и облучение при нормальной аэрации; Б - глюкозная нагрузка и облучение при гипоксии; В - глюкозная нагрузка при гипоксии, облучение при нормальной аэрации. Кривая 1 - глюкозная нагрузка и облучение, кривая 2 - только облучение.

тельности опухолевых клеток сдвигаются влево или вправо по оси абсцисс примерно параллельно самим себе; это позволяет строить такие кривые даже при относительно небольшом количестве экспериментальных данных. Коэффициент усиления эффектив-

ности облучения /КУЭ/ в результате глюкозной нагрузки рассчитывали как отношение TLD₅₀ только при облучении к TLD₅₀ при комбинации облучения с глюкозной нагрузкой.

На основании результатов трех независимых серий опытов, проведенных по описанной выше схеме, были рассчитаны значения TLD₅₀ для всех восьми вариантов комбинаций гипоксии, глюкозной нагрузки и облучения. Полученные данные схематически изображены на рис.2. Видно, что радиочувствительность опухолевых клеток определяется только условиями аэрации во время облучения и не зависит от кислородного статуса во время инкубации с глюкозой. В то же время усиление гибели облученных клеток под влиянием глюкозной нагрузки практически полностью определяется условиями аэрации во время их выдерживания с глюкозой и не зависит от того, в каких условиях происходило облучение.

Средние значения TLD₅₀ для всех восьми вариантов экспериментов и соответствующие им величины КУЭ приведены в таблице. Видно, что гипоксия во время облучения повышает TLD₅₀ по сравнению с облучением при нормальной аэрации с 15 до 30-40 Гр, т.е. в 2,0-2,5 раза. Комбинация облучения с обработкой клеток глюкозой в условиях нормальной аэрации в обоих случаях усиливает его эффективность незначительно, не более чем в 1,5 раза. В то же время предрадикационная обработка асцитных клеток глюкозой в условиях гипоксии приводит к уменьшению TLD₅₀ при облучении в гипоксии с 30 до 4,5 Гр, а при облучении в условиях нормальной аэрации - с 13 до 2,3 Гр, т.е. увеличивает эффективность облучения в 6-7 раз; значения КУЭ в обоих случаях практически совпадают.

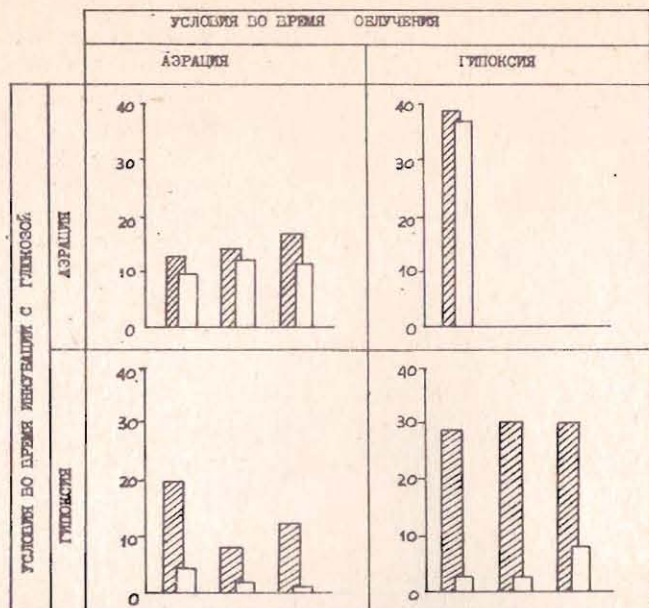


Рис.2. Зависимость TLD_{50} /в Гр/ для мышей-реципиентов от условий инкубации опухолевых клеток с глюкозной нагрузкой и условий облучения. Заштрихованные столбики - только облучение, светлые столбики - глюкозная нагрузка и облучение. Каждая пара столбиков соответствует результатам одного опыта.

Таблица
Влияние условий аэрации на эффективность комбинированного действия глюкозной нагрузки и облучения на опухолевые клетки

Условия инкубации клеток до облучения		Оксигенация во время облучения			
		Воздух		Гипоксия	
Аэрация	Наличие глюкозы	TLD_{50} , Гр	КУЭ	TLD_{50} , Гр	КУЭ
Воздух	без глюкозы	14,6±1,7	1,3	38*	1,0
	с глюкозой	11,5±1,6		37*	
Гипоксия	без глюкозы	13,2±4,8	6,0	29,6±0,3	6,8
	с глюкозой	2,3±1,2		4,3±2,3	

* Данные одного опыта.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, эффективность комбинированного действия на опухолевые клетки глюкозной нагрузки и облучения полностью определяется условиями аэрации во время их обработки глюкозой, независимо от того, совпадает ли это по времени с облучением, или нет. Это означает, что гипоксия независимо и разнонаправленно влияет на радиочувствительность опухолевых клеток и на их чувствительность к глюкозной нагрузке, уменьшая их чувствительность к облучению и увеличивая чувствительность к избытку глюкозы.

Особое внимание здесь следует обратить на то обстоятельство, что комбинированное применение глюкозной нагрузки при гипоксии и облучения в условиях нормальной аэрации обуславливает величину $TLD_{50} = 2,3$ Гр, что в 6 раз меньше, чем TLD_{50} при одном только облучении аэрированных опухолевых клеток и в 13 раз меньше, чем TLD_{50} при их облучении в условиях гипоксии /см. табл./ . Это дает основание рассматривать глюкозную нагрузку как эффективное средство борьбы с пулом гипоксических клеток в тех случаях, когда они определяют повышенную радиорезистентность опухолей и служат причиной пострадиационных рецидивов ^{15,6/}.

Существует ли, однако, связь между действием на опухолевые клетки облучения и глюкозной нагрузки, или же повреждение их избытком глюкозы и облучением не зависят одно от другого? Пока что мы не можем окончательно ответить на этот вопрос. Некоторые результаты, опубликованные ранее ^{14/} и полученные в предварительных экспериментах, позволяют только утверждать, что глюкозная нагрузка в условиях гипоксии и сама по себе, без облучения, может весьма губительно действовать на опухолевые клетки. В наших опытах это проявлялось в том, что мыши с инокулятами контрольных образцов опухолевых клеток /по $5 \cdot 10^6$ клеток на мышь/ погибали в среднем спустя $13,9 \pm 0,6$ суток, а мыши, которым прививали такое же количество клеток, предварительно ¹¹обработанных глюкозой, погибали в более поздние сроки - в среднем через $24,1 \pm 4,8$ суток /по данным семи независимых опытов/. Согласно колибровочной кривой, приведенной в ^{14/}, такому увеличению средней продолжительности жизни мышей-реципиентов соответствует уменьшение числа жизнеспособных клеток в инокулеуме примерно в сто раз.

Для выяснения механизмов, обуславливающих снижение жизнеспособности необлученных опухолевых клеток под влиянием глюкозной нагрузки, решающее значение будут иметь данные о зависимости эффективности таких воздействий от продолжительности инкубации клеток с глюкозой и от интервала времени между инкубацией их с глюкозой и облучением. Такие данные позволяют также ответить на вопрос о синергизме или аддитивности в летальном действии на опухолевые клетки глюкозной нагрузки и облучения, что важно для принципиальной разработки методов оптимизации применения гипергликемии в клинике.

Авторы благодарят проф. Л.Х.Эйдуса за обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров Н.Н. и др. Применение гипертермии и гипергликемии при лечении злокачественных опухолей. Изд-во "Медицина", М., 1980.
2. Ярмоненко С.П. и др. Мед.радиология, 1981, 26, с. 46.
3. Dinescu G. et al. Oncologia si Radiologia, 1971, 10, p.437.
4. Шмакова Н.Л. и др. ОИЯИ, 19-83-257, Дубна, 1983.
5. Ярмоненко С.П. Мед.радиология, 1983, 28, с.3.
6. Ярмоненко С.П. и др. Экспериментальная онкология, 1984, №2, с. 3.

Рукопись поступила в издательский отдел
8 августа 1984 года.

Ярмоненко С.П. и др.

P19-84-537

Роль гипоксии в действии глюкозной нагрузки на облученные опухолевые клетки

В опытах на клетках асцитной карциномы Эрлиха показано, что гипоксия, уменьшая летальное действие гамма-лучей, в то же время существенно увеличивает повреждение клеток под влиянием глюкозной нагрузки. При обработке опухолевых клеток глюкозой в условиях гипоксии с последующим облучением либо в гипоксии либо при нормальной оксигенации их пораженность, по сравнению с одним только облучением, усиливается в шесть-семь раз. Обнаружено также, что обработка глюкозой в условиях гипоксии /без сопутствующего облучения/ может приводить к гибели до 99% опухолевых клеток. Все это позволяет рассматривать глюкозную нагрузку в качестве эффективного средства преодоления радиорезистентности опухолей, обусловленной пулом гипоксических клеток, а также в качестве возможного самостоятельного противоопухолевого агента.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Преприят Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1984

Перевод О.С.Виноградовой

Yarmonenko S.P. et al.

P19-84-537

Role of Hypoxia in the Action of Glucose Load on Irradiated Tumor Cells

It is shown that in mouse Erlich ascite carcinoma cells (EAC, line ELD) hypoxia, while reducing the lethal effect of gamma rays, severely enhances cell injury by glucose load. Treatment of tumor cells with glucose under hypoxia, followed by irradiation in hypoxia or in normal aeration, increases cell injury 6-7 fold, as compared to irradiation alone. Moreover, glucose treatment in hypoxia conditions (without concomitant irradiation) may lead to death of up to 99 percent of tumor cells. These facts allow us to consider glucose loading as effective mean of overcoming radioresistance of tumors due to the pool of hypoxic cells, and even as a possible antitumor agent.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1984