

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-85-823

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

ЗАВИСИМОСТЬ КАНЦЕРОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ
АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА МЫШЕЙ
ОТ ЧИСЛА ИНТАКТНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Направлено в журнал "Neoplasma", СССР.

* Всесоюзный онкологический научный центр
АМН СССР, Москва

1985

В наших экспериментах клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) использовали для изучения эффективности некоторых противоопухолевых обработок /1/. В этом сообщении описаны материалы и методы, а также основные характеристики интактных клеток АКЭ. Полученные результаты позволили построить две калибровочные кривые, используемые в дальнейшем для анализа действия разных противоопухолевых средств; математические модели этих кривых описаны ранее /2/. Первая из этих кривых описывает зависимость смертности мышей (P) от числа введенных клеток АКЭ (M_1), вторая — зависимость от M_1 средней продолжительности жизни погибающих животных (γ). Имеющийся в нашем распоряжении весьма обширный экспериментальный материал позволил достаточно точно определить параметры формул, описывающих зависимости P(M_1) и $\gamma(M_1)$.

МАТЕРИАЛ, МЕТОДЫ И ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Экспериментальные методы

Подробности методики описаны в работе /3/. Клетки АКЭ извлекали из брюшной полости мышей-доноров P₁ (СВА х С57BL) на седьмой-восьмой день после перевивки. Клетки отмывали от асцитной жидкости, суспензию или разливали в пенициллиновые флаконы, которые герметично закрывали резиновыми пробками (оставляя пузырек воздуха не более 0,3 мм³), или вносили тонким слоем (около 3 мм) в несколько плоскодонных колб с диаметром дна 8 см, которые закрывали резиновыми пробками со стеклянными трубками, служившими для продувания газовой смеси, содержащей 50% кислорода. Флаконы и колбы для быстрого нагревания помещали на пять мин в водную баню при 37°C, а затем все пробы инкубировали в термостате, также при 37°C, при непрерывном встряхивании и продувании через колбы упомянутой газовой смеси. В этих условиях во флаконах, в результате дыхания клеток при практически полном отсутствии газовой фазы, создавалась глубокая гипоксия, в то время как в колбах клетки находились в условиях хорошей оксигенации. Через 30 мин к половине проб, не нарушая условий инкубации, добавляли 40% раствор глюкозы, так, чтобы конечная ее концентрация составляла 8 мг/мл; суспензию тщательно перемешивали и продолжали инкубацию еще 60 мин.



В радиобиологических экспериментах часть таких проб служила контролем, а часть облучали в разных дозах гамма-лучами ^{137}Cs (мощность дозы 4,6 Гр/мин). В течение 30 мин после облучения пробы сохраняли при комнатной температуре, затем помещали на лёд как для прекращения гликолиза, так и для сохранения сложившихся условий оксигенации вплоть до перевивки мышам-реципиентам. Контрольные (необлученные) пробы выдерживали при комнатной температуре в течение часа, а затем также помещали на лёд.

Значения pH клеточных суспензий (исходных и перед перевивкой) измеряли с помощью pH-метра. Величина pH у исходных суспензий варьировала в диапазоне 6,6 + 6,9, составляя в среднем 6,75 ± 0,07.

Эффективность облучения, а также других воздействий на клетки АКЭ оценивали по их "выживаемости", которую определяли следующим образом ^{/3/}. Мышам-реципиентам, предварительно подвергнутым тотальному облучению в дозе 3 Гр (для подавления иммунитета), вводили внутривенно по 0,5 мл суспензии, содержащей разное число клеток. В течение двух месяцев регистрировали гибель таких животных от развивающихся опухолей, а также среднюю продолжительность жизни погибающих мышей. Обработка результатов по описанному ранее ^{/2/} методу позволяла судить о доле не погибших (точнее, способных образовывать опухоль) клеток в инокулеуме.

Статистический анализ

По результатам экспериментов рассчитывали среднюю продолжительность жизни (\bar{T}) и стандартное отклонение (ΔT). Вследствие различий между разными экспериментами минимальная величина стандартного отклонения была принята равной ± 3 дня. Сумма квадратов (S^2) рассчитывалась как

$$S^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(T_{\text{exp},i} - T_{\text{theor},i})^2}{\Delta T^2}, \quad (1)$$

и полученная величина минимизировалась методом крутого восхождения с целью оптимизации параметров, необходимых для вычисления \bar{T} . Допустимыми считали отклонения параметров на величины, увеличивающие S^2 до $S^2 + 1,0$ ^{/2/}.

При оценке гибели клеток (P) использовали метод максимальной вероятности. Величина P может зависеть от нескольких параметров и нескольких независимых переменных. Однако для каждой конкретной мыши результат имеет характер "да" или "нет" (мышь погибнет или останется живой). Следовательно, мы имеем

$$s^2 = - \sum_{(i)} \ln(\eta_i) - \sum_{(j)} \ln(1 - \eta_j), \quad (2)$$

где P_i - вероятность, рассчитанная для гибели мышей, а P_j - для их выживаемости. Отклонения параметров считались допустимыми, если они увеличивали S^2 не более чем до $S^2 + 0,5$ ^{/4/}.

Проверка результатов экспериментов

В наших экспериментах для каждой группы животных регистрировались два показателя: летальность P и средняя продолжительность жизни \bar{T} . Если количество клеток АКЭ в инокулеуме M_1 было достаточно велико, то смертность $P = 1$, а $\bar{T} = \bar{T}_0$, т.е. минимальной возможной величине. Когда число клеток в инокулеуме M_1 уменьшалось, средняя продолжительность жизни животных \bar{T} увеличивалась, и эта величина была единственным показателем, который можно было экспериментально определять в довольно широком диапазоне значений M_1 . Дальнейшее уменьшение значений M_1 приводило не только к увеличению \bar{T} , но и к уменьшению P.

В идеальном случае значения величин P и \bar{T} должны хорошо согласовываться друг с другом. В реальных экспериментах, однако, из-за воздействия ряда неконтролируемых факторов значения P и \bar{T} могут существенно отличаться от ожидаемых значений. Следовательно, полезно построить график $\bar{T}(P)$, чтобы выявить форму ожидаемой зависимости между \bar{T} и P. Точки, сильно отклоняющиеся от этой зависимости, можно исключить из рассмотрения, как явно ошибочные.

В соответствии с нашей моделью, приведенной в работе ^{/2/}, соотношение между \bar{T} и P имеет следующий вид:

$$\bar{T} = \bar{T}_0 + \frac{1}{A} (\ln(\eta M_1) - \frac{1}{A} (\ln| - \ln(1-P) |)); \quad (3)$$

таким образом, зависимость \bar{T} от $\ln| - \ln(1-P) |$ описывается прямой с наклоном $-1/A$. Более общее соотношение между \bar{T} и $\ln| - \ln(1-P) |$ можно получить из уравнений, приведенных в примечаниях А и В работы ^{/2/}. На практике для проверки корректности результатов экспериментальные точки следует сопоставлять с прямой $\bar{T}(P)$, описывающей зависимость \bar{T} от $\ln| - \ln(1-P) |$. Если экспериментальные точки достаточно близко расположены к этой прямой, их можно исключать как результаты случайных помех.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Зависимость $\mathcal{T}(M_1)$ (калибровочная кривая № 1)

В этой работе будут рассмотрены только результаты экспериментов с интактными клетками АКЭ. Согласно нашей модели [2], средняя продолжительность жизни погибающих животных \mathcal{T} должна зависеть от числа клеток в инокулиме M_1 следующим образом:

$$\mathcal{T}(M_1) = a_0 - b_0 \ln(M_1) \quad \text{для} \quad M_1 \leq M_K \quad (4, a)$$

$$\text{и} \quad \mathcal{T}(M_1) = \mathcal{T}_0 \quad \text{для} \quad M_1 \geq M_K, \quad (4, б)$$

где $b_0 = 1/\lambda$ и $\beta = \ln 2/T_d$; T_d - время удвоения популяции клеток АКЭ *in vivo*, $a_0 = \mathcal{T}_0 + 1/\beta \ln(M_K)$, где \mathcal{T}_0 - время, необходимое для гибели экспериментального животного после достижения клетками АКЭ критического числа M_K .

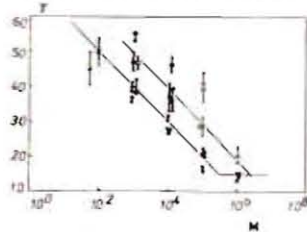


Рис. 1 Зависимость средней продолжительности жизни \mathcal{T} погибающих мышей-реципиентов от числа M_1 введенных им клеток АКЭ. Сопоставление экспериментальных данных (точки) с теоретическими кривыми, рассчитанными по уравнению (4). Значения параметров уравнения приведены в тексте.

Зависимость $\mathcal{T}(M)$ в форме $\mathcal{T}(\ln M_1)$ изображена графически на рис. 1. Здесь представлены результаты двух серий экспериментов, проведенных с интервалом в один год. В первой серии было шесть независимых опытов, во второй - два опыта, для разных значений M_1 . Параметры, полученные путем анализа результатов первой серии опытов и использованные для построения кривой, приведенной на рис. 1 слева, имеют следующие значения: $a_0 = 69 \pm 7$ дней; $b_0 = 4,3 \pm 0,7$ дней; $\beta = 0,233 \pm 0,038$ дня⁻¹; $\mathcal{T}_0 = 15,3 \pm 0,6$ дня; $M_K = (2,0 + 4,3) \cdot 10^5$ или, в среднем, $2,6 \cdot 10^5$ клеток. Кривая, построенная на основании второй серии опытов, смещена вправо (рис. 1) и описывается такими же значениями этих параметров, за исключением M_K , равном в этом случае $(1,0 + 5,0) \cdot 10^6$ или, в среднем, $2 \cdot 10^6$ клеток. Обе кривые хорошо соответствуют экспериментальным данным.

Зависимость $P(M_1)$ (калибровочная кривая № 2)

Для того, чтобы построить зависимость $P(M_1)$, экспериментальные данные были подвергнуты проверке описанным выше способом, после чего некоторые точки были исключены. В диапазоне, где $0 \leq P \leq 1$, судьба

популяций клеток АКЭ в отдельных мышах-реципиентах не ясна, что и служит причиной обнаруженных в наших опытах флуктуаций значений P и \mathcal{T} . К счастью, в этом диапазоне значений P и \mathcal{T} могут быть определены на одном и том же экспериментальном материале, что позволяет использовать величины \mathcal{T} для проверки описанным выше способом достоверности величин P , и наоборот.

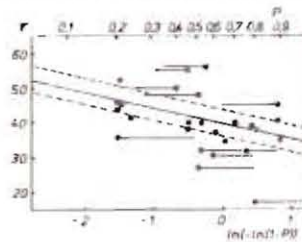


Рис. 2 Зависимость средней продолжительности жизни \mathcal{T} погибающих мышей-реципиентов от их смертности P . Приведены теоретическая кривая, рассчитанная по уравнению (3), и ее доверительные границы. Экспериментальные точки нанесены с их стандартными отклонениями от теоретической кривой. Если точки достаточно удалены от теоретической кривой (т.е. когда их стандартные отклонения не пересекают доверительных границ), их следует исключить из рассмотрения как недостоверные.

Согласно нашей модели, величина \mathcal{T} должна быть линейно связана с двойным логарифмом величины $(1 - P)$. Соответствующий график приведен на рис. 2. Здесь же нанесены экспериментальные точки, которые сопоставляли с теоретической кривой. Когда статистическая ошибка не была достаточно близка к доверительным границам этой кривой, обозначенным пунктирными линиями, такие точки из дальнейшего рассмотрения исключались.

Наклон прямой $\mathcal{T}(P)$ был принят равным $-\frac{1}{\beta}$. Он может несколько отличаться от этой величины (см. приложение А в работе [2]), что, однако, не влияет на заключение о законности отбраковки описанным выше способом некоторых экспериментальных данных.

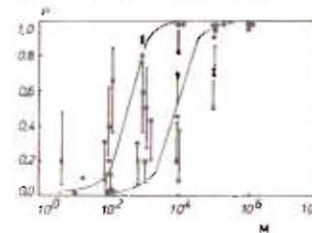


Рис. 3 Зависимость смертности мышей-реципиентов P от числа M_1 введенных им клеток АКЭ. Сопоставление экспериментальных данных (точки) с теоретическими кривыми, построенными по уравнению (5). Значения параметров уравнения приведены в тексте.

Зависимость $P(M_1)$, построенная таким способом, приведена на рис. 3. Эта зависимость хорошо описывается уравнением

$$P = 1 - \exp(-1q M_1^\beta), \quad (5)$$

в котором величина r существенно не отличается от 1. Принимая $r = 1$, легко найти величину q . Кривая $P(M_1)$, приведенная слева на рис. 3, построена для значения $q = 0,0016$ ($0,0011 + 0,0024$). Кривой $P(M_1)$, приведенной справа, соответствует $q = 0,00069$ ($0,000015 + 0,00020$).

Полученные результаты хорошо подтверждают принятое ранее [2] допущение, что между клетками АКЭ при формировании опухоли взаимодействия практически отсутствует, т.е. каждая клетка вносит свой вклад в популяцию АКЭ, растущую в брюшной полости мыши-реципиента, с некоторой постоянной вероятностью. На основании приведенных выше данных можно рассчитать, что число интактных клеток АКЭ, вызывающее гибель 50% мышей-реципиентов, для первой серии опытов составляло $M50\% = 430$, а для второй серии опытов — 6250. Наклон кривой $P(M_1)$ на графике $P(1 \mid M_1)$ в обоих случаях постоянен и равен $1/\ln M_1 = 0,346$.

Заключение

На основании результатов наших экспериментов с интактными (контрольными) клетками АКЭ с достаточной точностью были рассчитаны параметры кривых, описывающих зависимость $P(M_1)$ и $r(M_1)$. В дальнейших работах эти кривые будут использованы в качестве калибровочных. Показано также, что модельные уравнения, полученные в работе [2], хорошо описывают экспериментальные данные (суммы квадратов отклонений на одну степень свободы близки к 1). Время удвоения числа клеток АКЭ в брюшной полости мышей-реципиентов $T = 3,0$ дня; критическое число клеток АКЭ для первой серии экспериментов равно $2,6 \cdot 10^5$, а для второй серии — $2 \cdot 10^6$. Критическое время T_0 , проходящее от момента достижения клетками величины M_k до гибели животного, для обеих серий экспериментов оказалось равным 15,3 дня. Смертность животных P пропорциональна числу введенных клеток АКЭ (для малого их количества), а вероятность образования опухоли в расчете на одну клетку q для первой серии экспериментов равнялась 0,0016, а для второй — 0,00069. Число $M50\%$ клеток АКЭ, приводящее к гибели 50% животных, для первой серии экспериментов равно в среднем 430, а для второй серии — 6250. Причины, обуславливающие эти различия, не ясны и требуют специальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ярмоненко С.П., Корогодин В.И. Метаболические подходы к терапии злокачественных опухолей. Препринт ОИЯИ, Р19-85-821, Дубна, 1985.

2. Козубек С., Корогодин В.И., Лазер К., Шмакова Н.Л., Ярмоненко С.П. Математическая модель возникновения асцитной карциномы Эрлиха из клеток, вводимых мышам-реципиентам. Препринт ОИЯИ, Р19-85-822, Дубна, 1985.
3. Шмакова Н.Л., Лазер К., Ушанова Г.С., Фадеева Т.А. Проблема усиления биологического действия ионизирующих излучений. Глюкоза как средство повышения радиочувствительности клеток асцитной карциномы Эрлиха. Радиобиология, 1984, 24, 4, 172-175.
4. Rao C.R. Linear statistical inference and its applications. J.Wiley & Sons, N.Y., 1973.

Рукопись поступила в издательский отдел
18 ноября 1985 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

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

Д17-81-758	Труды II Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1981.	5 р. 40 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.
Д3,4-82-704	Труды IV Международной школы по нейтронной физике. Дубна, 1982.	5 р. 00 к.
Д11-83-511	Труды совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1982.	2 р. 50 к.
Д7-83-644	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Алушта, 1983.	6 р. 55 к.
Д2,13-83-689	Труды рабочего совещания по проблемам излучения и детектирования гравитационных волн. Дубна, 1983.	2 р. 00 к.
Д13-84-63	Труды XI Международного симпозиума по ядерной электронике. Братислава, Чехословакия, 1983.	4 р. 50 к.
Д2-84-366	Труды 7 Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1984.	4 р. 30
Д1,2-84-599	Труды VII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1984.	5 р. 50 к.
Д17-84-850	Труды III Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1984. /2 тома/	7 р. 75
Д10,11-84-818	Труды V Международного совещания по проблемам математического моделирования, программированию и математическим методам решения физических задач. Дубна, 1983.	3 р. 50
	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984 /2 тома/	13 р. 50 к.
Д4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра, Алушта, 1985.	3 р. 75

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

Шмакова Н.Л. и др.

P19-85-823

Зависимость канцерогенного действия асцитной карциномы Эрлиха мышей от числа интактных опухолевых клеток

Определена зависимость смертности мышей-реципиентов и средней продолжительности их жизни от числа интактных клеток асцитной карциномы Эрлиха /АКЭ/. Результаты интерпретированы в терминах предложенной ранее математической модели. Определены время удвоения популяции АКЭ, их канцерогенность и другие параметры.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1985

Перевод авторов.

Shmakova N.L. et al.

P19-85-823

Control Dependences of Ehrlich Ascites Tumour Cancerogenesis from in vitro Treated Cells

The dependences of the mouse lethality and average life length on the number of Ehrlich ascites tumour (EAT) cells have been measured and analysed in terms of the mathematical model proposed earlier. EAT cells population doubling time, the cancerogeneity of EAT cells and other parameters have been determined.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1985