

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-85-825

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

ДЕТАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛЮКОЗНОЙ НАГРУЗКИ
НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Направлено в журнал "Neoplasma", ЧССР

* Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР,
Москва

1985

При изучении кратковременной пострadiационной гипергликемии /1/ на солидной карциноме Эрлиха линии ELD была показана гибель значительной части опухолевых клеток под влиянием одной только глюкозной нагрузки, без облучения, в первые часы после воздействия, вероятнее всего до вступления в митоз. Было также установлено, что гибель клеток солидных опухолей под влиянием гипергликемии связана с нарушением в них микроциркуляции /2/. В последующих экспериментах на клетках асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) в условиях *in vitro* было установлено, что эффективность глюкозной нагрузки и сопровождающего ее облучения резко возрастает, если обработку клеток глюкозой проводить в гипоксии /3,4/. Были также получены данные, позволяющие предположить, что глюкозная нагрузка в гипоксии сама по себе может вызывать массовую гибель клеток АКЭ /4/. Как показано ниже, последующие эксперименты полностью подтвердили это предположение, а также позволили установить характер такой гибели клеток АКЭ.

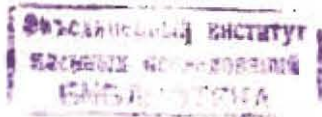
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал

Объектом исследования служили клетки АКЭ линии ELD, которые культивировали в брюшной полости мышей P₁ (CBA x C₅₇BL) путем переноски один раз в семь дней. Таких же мышей использовали как реципиентов при определении опухолеобразующей способности инокулятов АКЭ, содержащих разное число клеток.

Схема опытов

Семи-восьмидневный асцит извлекали из брюшной полости мышей-доноров, центрифугировали, осадок суспендировали в физиологическом растворе до концентрации около 10^7 кл./мл, инкубировали в 0,8%-ном растворе глюкозы 15 или 60 мин при нормальной оксигенации или в гипоксии (методику см. в работе /4/), а затем инокулировали, содержащие разное число клеток, вводили в брюшную полость мышей-реципиентов. Контролем служили клетки АКЭ, не подвергавшиеся глюкозной нагрузке.



Измерения pH проводили с помощью pH-метра pH-121. В контроле pH = 6,6±0,9, после обработки глюкозой в условиях оксигенации снижались до 5,5, а в условиях гипоксии — до 5,0±0,2.

У мышей-реципиентов, которым вводили клетки АКЭ, либо развивалась асцитная опухоль и они погибали, либо опухоль не образовывалась и они оставались живыми. Максимальное время от инъекции клеток до гибели мышей, как правило, не превышало 60 дней. В течение этого срока ежедневно регистрировали гибель мышей, что позволяло определять как долю погибших животных, так и среднюю продолжительность их жизни. Опыты проводили в нескольких повторностях. Для получения каждой "точки" использовали не менее 10-12 животных.

Обработка результатов

Математическая модель развития экспериментальных опухолей у мышей после инъекции им клеток АКЭ рассмотрена в работе [5]. Эта модель показывает, как связаны между собой число клеток АКЭ в инокуляте M , доля погибших от опухолей мышей P и средняя продолжительность их жизни \bar{T} , а именно:

$$P = 1 - \exp(-qMS), \quad (1)$$

где q — онкогенность инокулята в расчете на одну клетку АКЭ, а S — жизнеспособность этих клеток, тогда как

$$\bar{T} = \bar{T}_0 + \frac{1}{\beta} \ln M_k - \frac{1}{\beta} \ln(MS), \quad (2)$$

где β — средняя скорость размножения клеток АКЭ в брюшной полости мышей, а \bar{T}_0 — срок гибели этих мышей после достижения клетками АКЭ критического числа M_k .

С помощью формул (1) и (2), полагая в контроле $S = 1$, по результатам экспериментов можно рассчитать значения \bar{T}_0 , M_k , q и β , а также значения S для клеток АКЭ после того или иного воздействия. Заметим, что в последнем случае S будет равно их "выживаемости", т.е. относительному числу (по сравнению с контролем) сохранившихся онкогенность клеток. Доверительные границы параметров формул (1) и (2) находили так, как описано в работе [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Действие глюкозной нагрузки на жизнеспособность опухолевых клеток

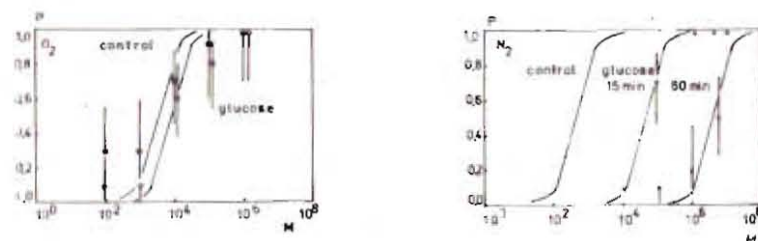


Рис.1 Влияние глюкозной нагрузки в условиях оксигенации (O_2) и гипоксии (N_2) на зависимость смертности мышей (P) от числа клеток АКЭ в инокуляте (M). Экспериментальные данные (точки) сопоставляются с теоретическими кривыми (сплошные линии). Слева для сравнения приведена кривая $P(M)$ для интактных клеток.

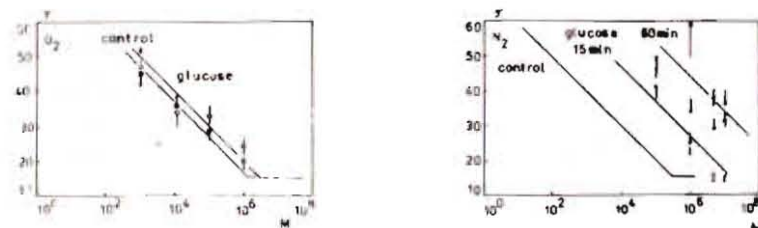


Рис.2 Влияние глюкозной нагрузки в условиях оксигенации (O_2) и гипоксии (N_2) на зависимость средней продолжительности жизни погибших мышей-реципиентов (\bar{T}) от числа клеток АКЭ в инокуляте (M). Экспериментальные данные (точки) сопоставляются с теоретическими кривыми (сплошные линии). Слева для сравнения приведена кривая $\bar{T}(M)$ для интактных клеток.

На рис.1 и 2 показаны контрольные кривые, построенные по результатам семи независимых опытов, в которых определяли зависимость смертности мышей (P) и средней продолжительности их жизни (\bar{T}) от числа

интактных клеток в инокуляте (M). С помощью ЭИМ было рассчитано, что в этих случаях, если принять, что жизнеспособность клеток АКЭ в интактных инокулятах $S = I$, параметры формул (1) и (2) имеют следующие значения: $M_R = 2,6 \cdot 10^5 (2 \cdot 10^5 + 4 \cdot 10^5)$, $\tau = 15,3 \pm 0,6$, $\varphi = 0,0016 (0,0011 + 0,0024)$ и $\beta = 0,233 \pm 0,038$. Кривые, построенные по формулам (1) и (2) с этими значениями их параметров, хорошо согласуются с экспериментальными данными.

На этих же рисунках разными значками показаны результаты экспериментов, в которых клетки АКЭ перед инъекцией мышам подвергали глюкозной нагрузке при оксигенации или в гипоксии.

Заметим, что, согласно формулам (1) и (2), выживаемость клеток АКЭ в разных группах опытов можно рассчитывать двумя способами, пользуясь независимо регистрируемыми показателями - P и τ : 1-й способ - по значениям P(M) и 2-й способ - по значениям τ (M). Чтобы провести такие расчеты, достаточно допустить, что величины φ и β имеют одинаковое значение как для контрольных, так и для опытных образцов, т.е. что глюкозная нагрузка приводит только к уменьшению выживаемости клеток АКЭ, но не влияет ни на онкогенность, ни на скорость размножения тех из них, которые остаются живыми.

Расчитанные обоими способами значения S для разных вариантов опытов приведены в таблице I. Оба способа дают согласующиеся результаты. Кривые на рис. 1 и 2, построенные по средним (для каждой группы опытов) значениям S, хорошо описывают экспериментальные данные. Это подтверждает правомочность сформулированной выше мысли о постоянстве значений φ и β для контрольных и опытных образцов клеток АКЭ и свидетельствует о ярко выраженном летальном действии глюкозной нагрузки на эти клетки в условиях гипоксии. Действительно, после 15-минутной обработки клеток АКЭ в этих условиях их выживаемость уменьшается примерно в 10^2 раз, а после 60-минутной обработки - примерно в 10^4 раз. Такое уменьшение выживаемости клеток АКЭ адекватно их облучению в аноксии в дозах порядка 20-40 Гр.

Форма гибели опухолевых клеток под влиянием глюкозной нагрузки

Для определения формы гибели клеток АКЭ в результате глюкозной нагрузки использовали следующий прием. Мышам вводили интрабрюшинно по $5 \cdot 10^7$ интактных или обработанных глюкозой клеток, через 24 и 48 час часть мышей декапсировали, а брюшную полость промывали физраствором. Часть полученной таким образом суспензии использовали для определения числа содержащихся в ней клеток (с помощью камеры Горяева), а часть - для приготовления препаратов. На окрашенных препаратах, пользуясь морфологическими критериями, оценивали относительное количество клеток АКЭ и иммунокомпетентных клеток мышей-реципиентов.

Таблица I. Влияние глюкозной нагрузки на выживаемость клеток АКЭ, рассчитанную двумя независимыми способами (пояснения в тексте).

Группа опытов	Доля выживших клеток АКЭ		Среднее
	1-й способ	2-й способ	
Контроль	I	I	I
Глюкозная нагрузка при оксигенации, 60 мин	0,40(0,2+1,4)	0,55(0,3+0,9)	0,49(0,2+0,9)
Глюкозная нагрузка при гипоксии, 15 мин	$1,0 \cdot 10^{-2} (5 \cdot 10^{-3} + 2 \cdot 10^{-2})$	$2,2 \cdot 10^{-2} (1 \cdot 10^{-2} + 4,5 \cdot 10^{-2})$	$1,6 \cdot 10^{-2} (1 \cdot 10^{-2} + 3 \cdot 10^{-2})$
Глюкозная нагрузка при гипоксии, 60 мин	$1,3 \cdot 10^{-4} (7 \cdot 10^{-5} + 2,5 \cdot 10^{-4})$	$3,5 \cdot 10^{-4} (1 \cdot 10^{-4} + 1 \cdot 10^{-3})$	$2,2 \cdot 10^{-4} (1 \cdot 10^{-4} + 2,5 \cdot 10^{-4})$

Результаты этих опытов показали следующее. Через 24 час после введения инкубированных без глюкозы (интактных) клеток АКЭ общее число клеток в асцитной жидкости мышей слегка превышало их число в инокуляте, а к 48 час увеличивалось в полтора-два раза. На препаратах, приготовленных в эти же сроки, основную массу (до 80%) составляли клетки АКЭ, а содержание лейкоцитов и лимфоцитов не превышало 20%. В отличие от этого, количество клеток, содержащихся в брюшной полости мышей после инъекции им образцов клеток АКЭ, инкубированных с глюкозой, к 24 час уменьшалось в десять раз и далее не изменялось. На окрашенных препаратах опухолевые клетки вообще не были обнаружены, а присутствовали лишь лейкоциты, лимфоциты и клетки мезотелия. Приближенные оценки, сделанные на основании этих данных, показали (табл. 2), что в течение суток после инъекции мышам клеток АКЭ, обработанных глюкозой, более 99% их бесследно исчезает, — вероятно, в результате лизиса или активного фагоцитоза. Это хорошо согласуется с оценкой летального действия глюкозной нагрузки на клетки АКЭ, проведенной по другим критериям (см. табл. I).

Таблица 2. Влияние предварительной глюкозной нагрузки на содержание клеток АКЭ в брюшной полости мышей-реципиентов

Группа опытов	Число клеток АКЭ в инокуляте	Число клеток в брюшной полости мыши		Содержание клеток АКЭ к 24 час	
		24 час	48 час	на препаратах	в брюшной полости
Контроль	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$	80%	$8 \cdot 10^7$
Глюкозная нагрузка при гипоксии, 60 мин.	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	1%	10^5

Таким образом, массовая гибель клеток АКЭ в результате глюкозной нагрузки происходит в течение первых суток после их инъекции мышам, когда митотическая активность этих клеток подавлена. Это означает, что такие клетки погибают в интерфазе, скорее всего по типу ранней паклотической дегенерации. Заметим, что после действия ионизирующих излучений летально-поврежденные клетки АКЭ сохраняются в брюшной полости мышей-реципиентов не менее двух суток и погибают лишь при попытке вступить в митоз или после нескольких делений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Приведенные данные убедительно свидетельствуют, что глюкозная нагрузка в условиях гипоксии вызывает массовую гибель опухолевых клеток. Тот факт, что обработка глюкозой клеток АКЭ в гипоксии способствует интенсивному гликолизу и резкому уменьшению pH, позволяет думать, что летальные последствия такой обработки могут быть следствием "самозакисления" этих клеток ^{/6/}.

Тесная связь летального действия глюкозной нагрузки на клетки АКЭ с присущим им анаэробным гликолизом позволяет утверждать следующее. Во-первых, можно полагать, что глюкозная нагрузка может оказывать летальное действие только на опухолевые клетки, во будет совершенно безвредной для клеток нормальных тканей, которые практически неспособны осуществлять анаэробный гликолиз. Во-вторых, следует ожидать, что противоопухолевое действие глюкозной нагрузки будет проявляться тем ярче, чем сильнее выражено у клеток той или иной опухоли свойство анаэробно обрабатывать глюкозу. В-третьих, можно думать, что эти закономерности будут проявляться не только *in vitro*, но и *in vivo*, в условиях целостного организма.

Последнее предположение хорошо согласуется со следующими фактами. В работе ^{/7/} показано, что инъекция мышам аллаксана, нарушающего утилизацию глюкозы (экспериментальный диабет), приводит не только к повышению в три-четыре раза содержания глюкозы в крови по сравнению с нормой, но и к уменьшению опухолеобразующей активности прививаемых таким мышам клеток АКЭ, что эквивалентно уменьшению жизнеспособности этих клеток примерно в десять раз. В работе ^{/2/} показано, что у мышей гипергликемия сама по себе может вызывать гибель клеток солидных опухолей. Согласно уже упоминавшимся данным ^{/1/}, гипергликемия, создаваемая как до, так и после рентгеновского облучения солидных опухолей мышей, существенно усиливает его действие, — вероятнее всего, за счет преимущественного "выбивания" клеток гипоксического пула, обладающих повышенной радиорезистентностью ^{/8/}. Наконец, как показали морфологические исследования, проведенные на опухолях животных и человека, гипергликемия приводит к гибели клеток только в тех зонах опухолей, которые характеризуются плохим кровоснабжением; в хорошо кровоснабжаемых участках опухолей, а также в микрометастазах, где отсутствует гипоксия, клетки остаются живыми.

Все это подкрепляет представления о гипергликемии как о перспективном адьюванте в комплексной терапии рака, по крайней мере, в отношении опухолей, обладающих повышенной гликолитической активностью, и в сочетании с индуцированной гипоксией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ярмоненко С.П., Шапот В.С., Волошина Е.А., Горожанская Е.Г., Доскалкин Ж.Д., Кримкер В.М. Избирательное усиление противоопухолевого действия радиации с помощью кратковременной гипергликемии. Мед. радиология, 1981, № 2, с.46-50.
2. Мецерилова В.В., Волошина Е.А. Снижение жизнеспособности облученных клеток опухоли под влиянием гипергликемии. Мед. радиология, 1983, № 7, с.13-16.
3. Шмакова Н.Л., Лазер К., Ярмоненко С.П., Векслер А.М., Эйбус Л.Х. Радиомодифицирующий эффект глюкозной нагрузки на оксигенированные и гипоксические опухолевые клетки. Мед. радиология, 1984, № 12, с.17-20.
4. Ярмоненко С.П., Шмакова Н.Л., Лазер К., Корогодин В.И. Роль гипоксии в действии глюкозной нагрузки на облученные опухолевые клетки. Радиобиология, 1985, 25, 2, с.196-199.
5. 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 ОИИИ, P19-85-822 Дубна, 1985.
6. Ardenne von M., Reitnauer P.G. Übersauerung agarbanze und pH der Tumor zelle in ihrer Beziehung zur Krebs-Mehrschrit Therapie. Acta biol. med. germ., 1970, 25, p.383-393.
7. Pavelic K., Slijepcevic M., Pavelic J., Jvic J., Audy-Jurkovic Z., Boranic M. Growth and treatment of Erlich tumor in mice with alloxan-induced diabetes. Cancer Res., 1979, No.5, p.1807-1813.
8. Ярмоненко С.П. Гипоксические клетки опухолей - мишень для направленной модификации радиочувствительности при лучевой терапии. Мед. радиология, 1983, № 7, с.3.

Рукопись поступила в издательский отдел
18 ноября 1985 года.

Шмакова Н.Л. и др.

P19-85-825

Летальное действие глюкозной нагрузки
на опухолевые клетки

Обработка клеток асцитной карциномы Эрлиха /АКЭ/ *in vitro* глюкозой в течение 15 и 60 мин в условиях гипоксии приводит к уменьшению их выживаемости в 10^2 и 10^4 раз. Глюкозная нагрузка в условиях нормальной оксигенации неэффективна. Массовая гибель клеток в результате глюкозной нагрузки в гипоксии происходит в интерфазе, в течение первых суток. В основе летального действия глюкозы на клетки АКЭ лежит свойственный им интенсивный гликолиз, приводящий к уменьшению pH.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1985

Перевод авторов

Shmakova N.L. et al.

P19-85-825

Lethal Effect of the Glucose Load Upon Tumour Cells

The *in vitro* treatment of the Ehrlich ascites tumour (EAT) cells by glucose for 15 min and 60 min under hypoxic conditions leads to the decrease of their survival by a factor of 10^2 and 10^4 . Glucose load is ineffective under normal oxygenation. The mass destruction of cells EAT to the glucose load takes place within the first 24 hours in the interphase. The lethal effect of glucose on EAT cells is to be based on their characteristic intensive glycolysis, resulting in a drastic drop of intracellular pH.

The investigation has been performed of Nuclear Problem, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1985