

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-85-826

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

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ
НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ
ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ
И ГЛЮКОЗНОЙ НАГРУЗКИ: СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ,
СИНЕРГИЗМ ИЛИ АДДИТИВНОСТЬ?

Направлено в журнал "Neoplasma", ЧССР

* Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР,
Москва

1985

Ранее в опытах на мышах с перевиваемыми опухолями было показано, что гипергликемия, создаваемая в организме до или после облучения, избирательно усиливает противоопухолевый радиационный эффект ^{/1/}. При изучении количественных закономерностей этого феномена была использована следующая методика: опухолевые клетки извлекали из брюшной полости мышей-доноров, подвергали глюкозной нагрузке и/или воздействию ионизирующих излучений, вводили интратрихно мышам-реципиентам, и по опухолеобразующей активности инокулятов судили о жизнеспособности составляющих их клеток ^{/2,3/}. Дальнейшие исследования ^{/4/} показали, что эффективность такого комбинированного воздействия зависит от того, в каких условиях происходит обработка клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) глюкозой: при нормальной оксигенации или в гипоксии; только во втором случае эффект ярко выражен и хорошо воспроизводим (рис.1). Эти результаты, однако, не позволили ответить на вопрос о

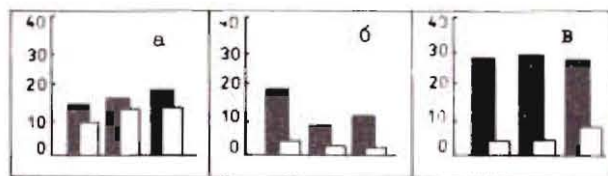
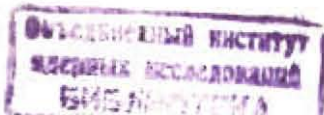


Рис.1 Зависимость TLD50 от условий облучения и обработки клеток АКЭ глюкозой: обработка глюкозой в присутствии кислорода (а) и в гипоксии (б, в); облучение в присутствии кислорода (а, б) и в гипоксии (в). Темные столбики - облучение; светлые - облучение в присутствии глюкозы. (Данные девяти независимых опытов).

природе усиления противоопухолевого действия облучения дополнительной глюкозной нагрузкой. Необходимо было выяснить, обусловлено ли оно взаимной сенсibilизацией клеток АКЭ облучением и глюкозой или, если учесть, что глюкозная нагрузка может сама по себе вызывать гибель клеток АКЭ ^{/5,6/}, следовало оценить, имеет ли место при комбинированном воздействии синергизм или аддитивность. Результаты опытов, призванных ответить на эти вопросы, приводятся ниже.



МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты

Объектом служили клетки АКЭ, штамм ВЛД. Донорами и реципиентами служили мыши-самцы F_1 (СВА x C_{57} -ВЛ). Клетки АКЭ культивировали в брюшной полости доноров, а при определении опухолеобразующей активности интактных или подвергнутых тому или иному воздействию клеток их вводили внутрибрюшинно реципиентам.

Схема опытов

Клетки АКЭ на седьмой день после перевивки извлекали из брюшной полости мышей-доноров, суспендировали в физрастворе до концентрации 10^7 на мл и делили на несколько порций. Часть таких порций служила контролем, другие подвергали различным воздействиям: обработке 0,8%-ным раствором глюкозы в течение 15 или 60 мин, облучению в дозе 20 Гр, или глюкозной обработке и облучению. Затем клетки АКЭ в разных количествах вводили мышам-реципиентам и в течение 60 суток регистрировали гибель животных в результате образования опухолей. Обработка глюкозой приводила к уменьшению pH суспензии до 5,2 (15 мин) и 5,0 (60 мин).

Обработка результатов

Как было показано ранее [7], смертность (P) и средняя продолжительность жизни (T) мышей-реципиентов зависят от числа клеток в инокулиме (M) следующим образом:

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

$$T = T_0 + \frac{1}{\beta} M_k - \frac{1}{\beta} \ln(MS), \quad (2)$$

где q – опухолеобразующая активность инокулима в расчете на одну клетку АКЭ, β – скорость размножения таких клеток в брюшной полости мыши, T_0 – срок гибели мышей после достижения клетками АКЭ критического числа M_k , а S – доля жизнеспособных клеток в инокулиме. При использовании компьютерной программы уравнения (1) и (2) могут быть применены для анализа экспериментальных данных и определения величины S с ее доверительными интервалами. Следует подчеркнуть, что S можно рассчитать двумя способами, используя независимо регистрируемые результаты: по зависимости $P(M)$ (1-й способ) и по зависимости $T(M)$ (2-й способ).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Параметры уравнений $P(M)$ и $T(M)$ для интактных клеток АКЭ были определены в нашей предыдущей работе [2]: $q = 0,0160$; $\beta = 0,233 \text{ дня}^{-1}$; $T_0 = 15,3$ дня; $M_k = 2,6 \cdot 10^5$ клеток. Кривые $P(M)$ и $T(M)$, рассчитанные по данным параметрам, приведены на рис.2 и 3.

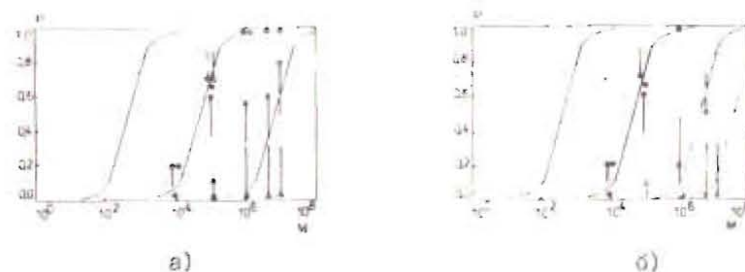


Рис.2 Зависимость смертности мышей-реципиентов (P) от числа клеток АКЭ в инокулиме (M) после их облучения в дозе 20 Гр, инкубации с глюкозой в течение 15 и 60 мин (а и б соответственно), а также после комбинированного воздействия. Экспериментальные точки сопоставляются с теоретическими кривыми. Слева приведена контрольная кривая $P(M)$; ● 20 Гр, ○ глюкоза, Δ глюкоза+20 Гр.

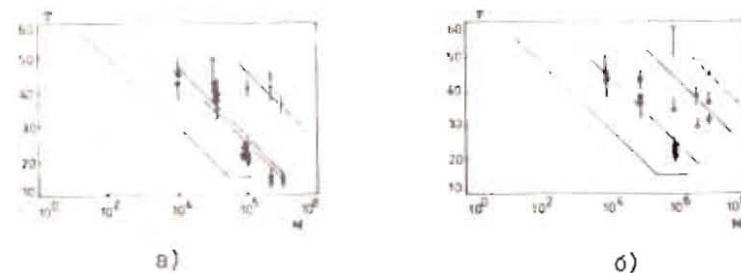


Рис.3 Зависимость средней продолжительности жизни (T) погибающих от опухолей мышей от числа клеток АКЭ в инокулиме (M) после их облучения в дозе 20 Гр, инкубации с глюкозой в течение 15 и 60 мин, и после комбинированного воздействия. Экспериментальные точки сопоставляются с теоретическими кривыми. Слева приведена контрольная кривая $T(M)$; ● 20 Гр, ○ глюкоза, Δ глюкоза+20 Гр.

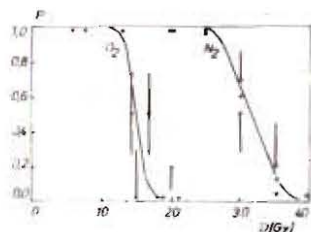


Рис.4 Зависимость P от дозы облучения (D) клеток АКЗ в присутствии кислорода (O_2) или в гипоксии (N_2). $M = 5 \cdot 10^6$. Экспериментальные точки сопоставляются с теоретическими кривыми.

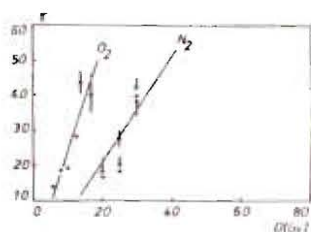


Рис.5 Зависимость T от дозы облучения (D) клеток АКЗ в присутствии кислорода (O_2) или в гипоксии (N_2). $M = 5 \cdot 10^6$. Экспериментальные точки сопоставляются с теоретическими кривыми.

На рис.4 и 5 представлены данные о зависимостях $P(D)$ и $T(D)$ для мышей, которым инъецировали клетки АКЗ в количестве $5 \cdot 10^6$ после облучения этих клеток гамма-квантами ^{137}Cs . Кривые на этих рисунках построены согласно (1) и (2) для значений $S(D)$, рассчитанных по многомишенной одноударной формуле для $D_0 = 2,85 \text{ Гр}$ и $m = 17$; эти параметры кривой выживания клеток АКЗ были определены в работе /8/ и хорошо согласуются с экспериментальными данными.

На рис.2 и 3 приведены теоретические кривые $P(M)$ и $T(M)$ и результаты экспериментов, полученные при облучении клеток АКЗ в дозе 20 Гр, при глицерозной обработке в течение 15 мин (а) и 60 мин (б), а также при комбинированном воздействии. Теоретические кривые были построены для таких же значений q , β , T_0 и M_K , что и для интактных клеток, и для усредненных значений S , рассчитанных двумя независимыми способами (см. табл.). Такие же параметры клеточной выживаемости были использованы для расчета $P(D)$ и $T(D)$ (рис.2 и 3) после 15 и 60 мин обработки клеток глицерозой в условиях гипоксии; жизнеспособность таких клеток составила $1,6 \cdot 10^{-2}$ и $2,2 \cdot 10^{-4}$ соответственно. Хорошее согласование теоретических кривых и экспериментальных данных означает, что сделанное допущение о постоянстве значений q , β , T_0 и M_K для контрольных и опытных групп клеток АКЗ вполне правомочно; таким образом, для интерпретации результатов экспериментов можно считать, что обработка клеток АКЗ глицерозой или облучение ионизирующей радиацией вызывает только гибель части этих клеток, но не влияет ни на их опухолеобразующую активность, ни на скорость размножения тех из них, которые выжили.

Таблица. Выживаемость клеток АКЗ после облучения, глицерозной нагрузки и комбинированного воздействия, определявшаяся двумя способами (пояснения в тексте). В скобках приведены доверительные границы средних.

Группа опытов	Выживаемость клеток АКЗ	
	1-й способ	2-й способ
Облучение в дозе 20 Гр	$1 \cdot 10^{-2}(7 \cdot 10^{-3} + 1,5 \cdot 10^{-2})$	$2,5 \cdot 10^{-2}(9 \cdot 10^{-3} + 5 \cdot 10^{-2})$
Обработка глицерозой, 15 мин.	$1 \cdot 10^{-2}(5 \cdot 10^{-3} + 2 \cdot 10^{-2})$	$2,2 \cdot 10^{-2}(1 \cdot 10^{-2} + 4,5 \cdot 10^{-2})$
Обработка глицерозой, 60 мин.	$1,3 \cdot 10^{-4}(7 \cdot 10^{-5} + 2,5 \cdot 10^{-4})$	$3,5 \cdot 10^{-4}(1 \cdot 10^{-4} + 1 \cdot 10^{-3})$
Глицероза 15 мин. + облучение в дозе 20 Гр	$7,1 \cdot 10^{-5}(2,5 \cdot 10^{-5} + 2,5 \cdot 10^{-4})$	$2,5 \cdot 10^{-4}(1,3 \cdot 10^{-4} + 4,5 \cdot 10^{-4})$
Глицероза 60 мин. + облучение в дозе 20 Гр	$1 \cdot 10^{-5}(0 + 2,5 \cdot 10^{-5})$	$3 \cdot 10^{-5}$

Из таблицы видно, что облучение в дозе 20 Гр уменьшает выживаемость клеток АКЗ в среднем от 1 до $1,7 \cdot 10^{-2}$; глицерозная нагрузка в условиях гипоксии в течение 15 и 60 мин — до $1,6 \cdot 10^{-2}$ и $2,2 \cdot 10^{-4}$; комбинированная обработка глицерозой и облучением — до $1,8 \cdot 10^{-4}$ (15 мин обработки) и $< 1,0 \cdot 10^{-5}$ (60 мин обработки).

ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.6 приведены кривые выживания клеток АКЗ, рассчитанные по параметрам, указанным выше. Символами нанесены экспериментально полученные значения выживаемости клеток после их облучения в дозе 20 Гр, после глицерозной нагрузки в течение 15 и 60 мин и после комбинированных воздействий. После комбинированных воздействий экспериментально полученные "точки" лежат на кривых выживания, параллельных кривой выживания только облученных клеток, но сдвинутых вниз по оси орди-

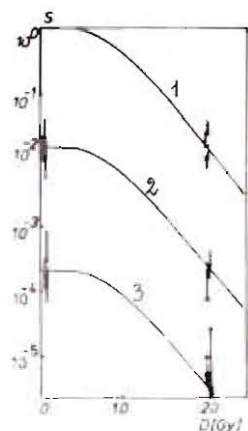


Рис.6 Теоретические кривые выживания клеток АКЗ после облучения в гипоксии сопоставляются с экспериментальными точками, полученными при оценке жизнеспособности этих клеток: после облучения в дозе 20 Гр (кривая 1); после глюкозной нагрузки в течение 15 и 60 мин и после комбинированных воздействий (кривые 2 и 3) (см. текст).

нат на величины, равные значениям выживаемости после одной только глюкозной нагрузки.

Данные, приведенные на рис.6, позволяют полагать, что резкое уменьшение выживаемости клеток АКЗ при комбинированном действии — облучения и глюкозной нагрузки (в гипоксии),

приводящей к снижению pH до 5,2–5,0, являлось следствием не столько радиосенсибилизации этих клеток, сколько их гибели при таких значениях pH^{6/}. Решающая роль в этом эффекте принадлежит гибели клеток АКЗ за счет только одной глюкозной нагрузки. Теоретические кривые на рис.6 были рассчитаны в соответствии с предположением о чистой аддитивности "глюкозного эффекта" и облучения, когда выживаемость клеток после комбинированного воздействия равна произведению выживаемостей после действия каждого агента в отдельности, т.е. $S_{xy} = S_x \cdot S_y$, где S_x — выживаемость после глюкозной нагрузки, а S_y — выживаемость после облучения. Видно, что при 15-минутной глюкозной нагрузке результат комбинированного воздействия практически совпадает с ожидаемым в случае аддитивности обоих эффектов. При 60-минутной глюкозной нагрузке эффект совместного действия несколько выше ожидаемого, но выживаемость клеток АКЗ в этом случае столь мала (менее 10^{-5}), а разброс данных отдельных опытов так велик, что оценить достоверность этого различия практически невозможно. Если радиочувствительность клеток, выживших после воздействия глюкозой, и повышается, то вклад этого феномена в суммарную выживаемость очень мал по сравнению с вкладом одной лишь глюкозной нагрузки.

Утверждение об аддитивности действия глюкозной нагрузки (pH = 5,2–5,0) и облучения хорошо согласуется с различиями типов гибели клеток АКЗ в результате каждого из этих воздействий. Пострадиационная гибель клеток связана с делением и обуславливается, скорее всего, разрывами молекул ДНК, приводящими к абберациям хромосом и нарушениям митоза; "глюкозная" гибель этих клеток происходит до вступления их в деление и вызывается, скорее всего, их "самозакислением" в результате интен-

сивного анаэробного гликолиза^{9/}. Из этого следует, что эффективность совместного действия облучения и глюкозной нагрузки не должна зависеть ни от последовательности их применения, ни от интервала времени между обоими воздействиями (конечно, в пределах одного клеточного цикла), ни от физических характеристик излучений (ЛПЭ, фракционирования и мощности дозы).

Так как глюкозная нагрузка при действии на опухолевые клетки эффективна только в условиях гипоксии и обусловлена их повышенной гликолитической активностью, можно думать, что на нормальные клетки гипергликемия не будет оказывать негативного влияния. И действительно, при экспериментальной гипергликемии, создаваемой у мышей с переносимыми опухолями, терапевтический эффект усиливается, а радиочувствительность самих животных не только не увеличивается, но даже несколько уменьшается^{11/}.

Все это позволяет рассматривать гипергликемию как весьма перспективное противоопухолевое средство, которое может получить применение не только в экспериментах, но и в клинике. При нормальной оксигенации гипергликемия должна поражать, главным образом, аноксический пул опухолевых клеток, обуславливающий радиорезистентность опухолей, и поэтому по отношению к опухоли в целом должна выступать как эффективный "радиосенсибилизатор". В комбинации с гипоксией гипергликемия может проявлять и самостоятельное противоопухолевое действие, сохраняя эффективность при многократном использовании и будучи совершенно безвредной для клеток нормальных тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ярмоненко С.П., Шапот В.С., Волошина Е.А., Горожанская Е.Г., Дускалиев К.Д., Кримкер В.М. Избирательное усиление противоопухолевого действия радиации с помощью кратковременной гипергликемии. Мед. радиология, 1981, № 2, с.46–50.
2. Шмакова Н.Л., Лазер К., Козубек С., Ярмоненко С.П., Корогодин В.И. Зависимость канцерогенного действия асцитной карциномы Эрлиха от числа интактных опухолевых клеток. Препринт ОИВИ, Р19-85-823, Дубна, 1985.
3. Шмакова Н.Л., Лазер К., Ярмоненко С.П., Векслер А.М., Элдус 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. Мещерикова В.В., Володина Е.А. Снижение жизнеспособности облученных клеток опухоли под влиянием гипергликемии. Мед. радиология, 1983, № 7, с.13-16.
6. Шамова Н.Л., Лазар К., Ярмоненко С.П., Козубек С., Корогодин В.И. Летальное действие глюкозной нагрузки на опухолевые клетки. Препринт ОИЯИ, P19-85-825, Дубна, 1985.
7. Козубек С., Корогодин В.И., Лазар К., Шамова Н.Л., Ярмоненко С.П. Математическая модель возникновения асцитной карциномы Эрлиха из клеток, вводимых млекопитающим. Препринт ОИЯИ, P19-85-822, Дубна, 1985.
8. Шамова Н.Л., Лазар К., Козубек С., Корогодин В.И., Ярмоненко С.П. Параметры кривых выживания клеток асцитной карциномы Эрлиха при облучении гамма-лучами в присутствии кислорода и в гипоксии. Препринт ОИЯИ, P19-85-824, Дубна, 1985.
9. Шапот В.С. Биохимические аспекты опухолевого роста. М., Медицина, 1975.

Рукопись поступила в издательский отдел
18 ноября 1985 года.

Шамова Н.Л. и др.

P19-85-826

Совместное действие на опухолевые клетки ионизирующих излучений и глюкозной нагрузки: сенсбилизация, синергизм или аддитивность?

Клетки асцитной карциномы Эрлиха подвергали глюкозной нагрузке (15 и 60 мин) в условиях гипоксии и/или облучали гамма-лучами в дозе 20 Гр. Эффект регистрировали по изменению опухолеобразующей активности этих клеток. Установлено, что ярко выраженный противоопухолевый эффект комбинированного воздействия обусловлен, в основном, аддитивностью действия глюкозы и облучения. Предполагается, что гипергликемия в комбинации с облучением может быть использована для избирательного поражения радиорезистентных клеток "аноксического пула", а в комбинации с гипоксией - как самостоятельное противоопухолевое средство.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1985

Перевод авторов

Shmakova N.L. et al.

P19-85-826

A Combined Effect of Irradiation and Glucose on Malignant Cells: Sensibilisation, Synergism or Additivity?

Ehrlich ascites tumour (EAT) cells were treated by glucose load in anoxic conditions (for 15 or 60 minutes) and/or gamma-radiation (20 Gy). The efficiency of the treatment was judged from the cancerogenic activity of EAT cell inoculums. The results of our experiments support the assumption that markedly increased efficiency of combined treatment of EAT cells by glucose load in anoxia and by irradiation is due to additive action of both agents. Hyperglycemia is shown to be perspective anti-tumour agent. It can be used in combination with radiation in order to destroy anoxic compartment of tumour tissue or in combination with hypoxia - as independent anti-tumour drug.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1985