

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-85-827

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

РОЛЬ рН В ЛЕТАЛЬНОМ ДЕЙСТВИИ
ГЛЮКОЗНОЙ НАГРУЗКИ
НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Направлено в журнал "Neoplasma", ЧССР

* Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР,
Москва

1985

В работе /1/ было установлено сильное летальное действие на опухолевые клетки глюкозной нагрузки в условиях гипоксии. Была установлена также аддитивность эффектов глюкозной нагрузки и облучения при их комбинированном воздействии на опухолевые клетки /2/. Однако механизм, обуславливающий "глюкозный эффект", выяснен не был. Можно было лишь предполагать, что благодаря свойству опухолевых клеток работать как "глюкозный насос", особенно в условиях гипоксии, большая роль должна принадлежать их "самозакислению" благодаря избыточному накоплению молочной кислоты /3/. В таком случае глюкозный эффект должен коррелировать с уменьшением pH, сопровождающим поддержание опухолевых клеток при избытке глюкозы; с другой стороны, этот эффект можно имитировать, уменьшая pH опухолевых клеток любым другим способом, - например, с помощью буферных растворов. Ниже приводятся результаты опытов, подтверждающие это предположение.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ

Объектом служили клетки височной карциномы Эрлиха (АКЭ), штамм ELD, которые культивировали в брюшной полости мышей P₁ (СВАхС₅₇-BL). При проведении опытов клетки АКЭ, извлеченные из брюшной полости мышей-доноров, в условиях *in vitro* при нормальной оксигенации или в гипоксии обрабатывали в течение 60 мин 0,8%-ным раствором глюкозы /4/ или выдерживали такое же время в физиологическом растворе с добавлением равного объема 0,2 М фосфатного буфера при pH = 7,0; 5,6; 5,3; 5,0 и 4,5. Содержание клеток в суспензиях равнялось 5·10⁶ в мл. У клеток, подвергнутых той или иной обработке, определяли жизнеспособность при последующей инкубации *in vitro* и после перевивки в брюшную полость мышей-реципиентов, а также их радиочувствительность.

При определении жизнеспособности *in vitro* клетки АКЭ, дважды отмытые от фосфатного буфера или глюкозы путем центрифугирования, помещали в питательную среду (20% сыворотки крупного рогатого скота, 40% среды Игла, 40% среды 199) и инкубировали в невинциллиновых флаконах при 37°C (в каждом флаконе по 3-5 мл суспензии, содержащей примерно по 10⁶ клеток в мл). Через 24 и 48 час клетки окрашивали трипановым синим и в камере Горяева подсчитывали количество "выживших" клеток, полагая, что окрашенные клетки являются погибшими.

При определении жизнеспособности клеток АКЭ *in vivo* использовали методику /1/. Радиочувствительности клеток при действии гамма-лучей ¹³⁷Cs определяли по методике /5/. При проведении всех количественных оценок и сопоставлений использовали подходы, развитые в работе /6/.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние pH на жизнеспособность клеток АКЭ, оцениваемую *in vitro*

Таблица I. Влияние pH среды на жизнеспособность клеток АКЭ при последующей инкубации *in vitro*. Исходная суспензия содержала около 5·10⁶ клеток в мл.

Условия аэрации	Среда инкубации	pH	# опыта	24 часа		48 часов	
				кл./мл × 10 ⁶	%	кл./мл × 10 ⁶	%
Воздух	Контроль	7,0	1	2,67	100	2,65	100
			2	3,31	100	3,93	100
	Глюкоза	5,6	1	1,89	70	2,03	77
			2	3,27	100	2,74	70
	Буфер	5,6	1	2,43	91	2,29	86
			2	2,33	70	2,98	76
	Буфер	5,0	1	0,41	15	0,35	13
			2	1,61	32	1,04	26
Гипоксия	Контроль	7,0	3	4,20	100	3,34	100
			4	2,97	100	3,27	100
	Буфер	5,6	3	4,33	104	3,67	112
			4	3,25	110	3,53	108
	Буфер	5,0	3	1,19	28	0,94	28
			4	1,48	50	0,87	27
	Глюкоза	5,0	3	1,45	34	0,64	19
			4	1,29	43	0,76	23

В таблице I приведены значения выживаемости клеток АКЭ, определявшейся после инкубации в течение 1 часа при разных условиях оксигенации и разных значениях pH, обуславливаемых либо гликолизом, либо фосфатным буфером. Видно, что в контрольных образцах в течение двух суток количество живых клеток уменьшается незначительно. Уменьшение числа живых клеток в опытных образцах имеет такой же характер, что и в контрольных, но степень его выраженности полностью определяется ве-

личной pH предварительной обработки: при pH = 5,6 жизнеспособность клеток не изменялась или лишь слегка уменьшалась по сравнению с контролем, а при pH = 5,0 уменьшалась в пять-шесть раз, независимо от того, достигалось ли данное значение pH гликолизом или фосфатным буфером и проходила ли инкубация клеток при оксигенации или в гипоксии.

Как было показано ранее [1], в брюшной полости мышей-реципиентов более 99% клеток, предварительно инкубированных с глюкозой в гипоксии (pH = 5,0), погибает в течение первых суток. По тесту перевиваемости асцитных опухолей фракция выживших клеток составляла всего $2,2 \cdot 10^{-4}$. Сопоставление данных таблицы I с этими результатами показывает, что вне организма отмирание таких клеток происходит медленнее и выражено слабее, чем в организме мышей-реципиентов. Поэтому была проведена серия опытов, в которой жизнеспособность клеток АКЭ, обработанных тем или иным способом, оценивалась по их опухолеобразующей активности.

Влияние pH на жизнеспособность клеток АКЭ, оцениваемую in vivo

Влияние pH на опухолеобразующую активность клеток АКЭ определяли путем измерения зависимости смертности (P) мышей-реципиентов от количества (M) введенных им клеток. Обработку клеток АКЭ фосфатным буфером проводили при pH = 7,0; 5,6; 5,3; 5,0 и 4,5 как в условиях хорошей оксигенации, так и в гипоксии, а глюкозой — до значений pH = 5,6 в присутствии кислорода и до pH = 5,0 в гипоксии, так как именно до этих величин, как правило, уменьшается pH суспензий клеток АКЭ в процессе гликолиза в указанных условиях [4].

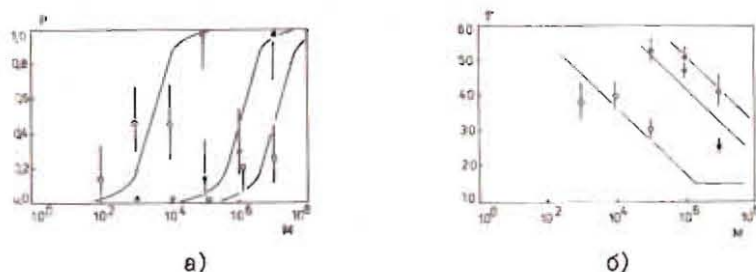


Рис. I Влияние инкубации клеток АКЭ при разных значениях pH на их жизнеспособность, оцениваемую по гибели мышей-реципиентов (а) и по средней продолжительности их жизни (б). pH = 7,0 (светлые кружки), pH = 5,0 (темные треугольники) и pH = 4,5 (светлые квадраты).

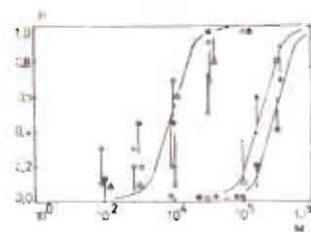


Рис. 2 Зависимость P(M) для клеток АКЭ, инкубируемых в присутствии кислорода или в гипоксии в средах с разными значениями pH. Различий между контрольной кривой (светлые кружки) и кривыми, полученными при pH = 7,0 (темные кружки) и pH = 5,6 (светлые треугольники) не обнаружено. В случае pH = 5,0 наблюдается одинаковый летальный эффект как при инкубации в буфере в присутствии кислорода (светлые квадраты) и в буфере в гипоксии (темные квадраты), так и при инкубации в глюкозе в гипоксии (темные треугольники).

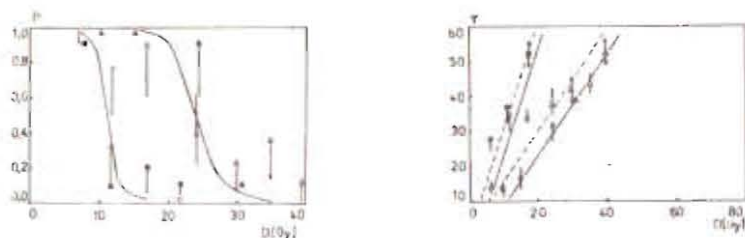
Результаты опытов приведены на рис. I и 2. По этим результатам, как было показано ранее [6], можно рассчитать влияние той или иной обработки на жизнеспособность клеток АКЭ. Видно, что инкубация клеток АКЭ при pH = 7,0 и 5,6, независимо от характера аэрации, никак не влияла на их жизнеспособность; инкубация таких клеток при pH = 5,0 в одинаковой степени (в 500-1000 раз) уменьшала их жизнеспособность, независимо от условий аэрации и способа уменьшения pH, а инкубация при pH = 4,5 оказалась еще более губительной — жизнеспособность клеток уменьшалась в 3500 раз. Таким образом, оценка влияния pH на жизнеспособность опухолевых клеток и в этом случае не позволила выявить различий в эффективности разных способов, обуславливающих то или иное его значение.

Влияние pH на радиочувствительность клеток АКЭ

В заключительной серии опытов было изучено влияние pH, создаваемого разными способами, на радиочувствительность клеток АКЭ.

По некоторым литературным данным [7,8] низкие значения pH (до 6,0) заметно повышают чувствительность клеток к ионизирующим излучениям; в наших же опытах [2] не было обнаружено радиосенсибилизации при совместном действии на клетки АКЭ глюкозной нагрузки (pH = 5,0) и облучения. Следовало выяснить, обусловлено ли это различие между нашими и литературными данными способами уменьшения pH или особенностями объекта.

Клетки АКЭ обрабатывали при разных значениях pH (глюкозная нагрузка или фосфатный буфер) в гипоксии или при оксигенации, а затем облучали в таких же условиях в разных дозах гамма-лучами. По $5 \cdot 10^6$ облученных клеток вводили мышам-реципиентам и определяли смертность этих животных в результате развития опухолей (P).



а)

б)

Рис.3. Влияние дозы облучения (D) на выживаемость клеток АКЭ при $pH = 5,6$ для $M = 10^5$ клеток, оцениваемую по гибели животных (а) и по средней продолжительности их жизни (б). Экспериментальные точки обозначают: контроль (светлые кружки и треугольники); инкубация с глюкозой (темные кружки и треугольники); облучение в присутствии кислорода (светлые и темные кружки); облучение в гипоксии (светлые и темные треугольники). Теоретическая кривая $P(M)$ рассчитана для $q = 6,9 \cdot 10^{-5}$, а теоретическая кривая $T(M)$ — для $M_K = 2,6 \cdot 10^5$ (сплошная линия) и $M_K = 2 \cdot 10^6$ (пунктирная линия) в соответствии с двумя группами контрольных экспериментов.

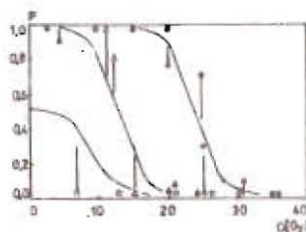


Рис.4. Зависимость $P(D)$ для клеток АКЭ, облученных в гипоксии после инкубации в буфере при $pH = 7,0$ (светлые кружки), $5,6$ (темные кружки), $5,3$ (светлые треугольники) и $5,0$ (светлые квадраты) или после инкубации с глюкозой при $pH = 5,0$ (темные треугольники).

Результаты определения зависимости смертности мышей-реципиентов от дозы облучения клеток АКЭ, подвергнутых разной обработке, приведены на рис.3 и 4.

Как показано на рис.3, гликозная нагрузка, приводящая к уменьшению pH до $5,6$, практически не влияет на летальное действие гамма-лучей на клетки АКЭ ни при их облучении в условиях хорошей аэрации, ни при их облучении в гипоксии; кривые смертности мышей-реципиентов для контрольных (только облучение) и опытных групп в обоих случаях совпадают. На рис.4 показано, что в том случае, когда гликозная нагрузка приводила к уменьшению pH до $5,0$, эффективность комбинированного дей-

ствия глюкозы и облучения существенно возрастала; примерно такая же эффективность наблюдалась при уменьшении pH до $5,0$ с помощью фосфатного буфера; уменьшение pH таким путем до $5,3$ было менее эффективно, а до $5,6$ и $7,0$ — практически не изменяло последствий одного только облучения.

Данные, приведенные на рис.2 и 4, позволяют выявить характер взаимодействия облучения клеток АКЭ и их обработки фосфатным буфером при $pH = 5,0$. Расчеты, проведенные по методу, описанному ранее [2], показали, что здесь имеет место аддитивность воздействия обоих повреждающих агентов: $S_{y, pH} = S_y \cdot S_{pH}$.

Таким образом, и по этому показателю действие на клетки АКЭ фосфатного буфера и гликозной нагрузки при равных значениях pH , достигаемых обоими способами, оказалось одинаковым.

ОБСУЖДЕНИЕ

Приведенные выше данные убедительно свидетельствуют о том, что летальное действие на клетки АКЭ гликозной нагрузки целиком и полностью обуславливается уменьшением pH — их "самозакислением" в результате интенсивного гликолиза. Это весьма ярко иллюстрирует таблица 2, построенная на основании всех экспериментальных данных, приведенных на рис.1-4: ни способ создания тех или иных значений pH , ни условия оксигенации никакого самостоятельного значения не имеют. Условия оксигенации играют решающую роль лишь при уменьшении pH клеток путем гликозной нагрузки: эффект Пастера обуславливает то, что при гипоксии гликолиз (а, следовательно, и уменьшение pH) значительно ярче выражен, чем при хорошей оксигенации.

Таблица 2 показывает также, что летальное действие низких pH на клетки АКЭ начинает проявляться и быстро возрастает лишь при уменьшении pH до $5,3$ и ниже. Таким образом, эффективность "самозакисления" имеет ярко выраженный порог. Вот почему гликозная нагрузка практически не влияет на клетки АКЭ при хорошей аэрации: в этих условиях, в результате эффекта Пастера, гликолиз осуществляется недостаточно эффективно и pH уменьшается только до $5,6$, не достигая порогового значения.

Хотя измерения pH как при гликозной нагрузке, так и при использовании фосфатных буферов мы проводили во внеклеточной среде (в суспензии), а не в самих клетках, данные, приведенные в ряде работ, позволяют считать, что внутриклеточное pH имеет примерно такое же значение [8,9] или несколько выше (на $0,1-0,2$) [10,11], чем pH окружающей среды.

Таблица 2. Влияние pH среды на жизнеспособность клеток АКЭ, определяющуюся по их опухолеобразующей активности.

pH	Среда инкубации	Условия аэрации	Доля жизнеспособных клеток АКЭ в инокуляте (относительные единицы)	
			В отдельных опытах	Среднее для данного значения pH*
7,0	Буфер	Гипоксия	2,9	2,9
5,6	Буфер	Гипоксия	1,9	2,6
		Воздух	6,8	
	Гликоза	Гипоксия	1,9	
		Воздух	1,8	
5,3	Буфер	Гипоксия	0,017	0,017
5,0	Буфер	Гипоксия	0,0010	0,0021
		Воздух	0,0046	
	Гликоза	Гипоксия	0,0020	
		Гипоксия	0,0008	
4,5	Буфер	Гипоксия	0,0008	0,0008

* Для расчета средних значений использовали логарифмы жизнеспособности.

Летальное действие низких pH на клетки связано, скорее всего, с деятельностью протеолитических ферментов, активность которых, как известно, быстро возрастает при уменьшении pH. Попадая в кислую среду или накапливая молочную кислоту в результате интенсивного гликолиза, клетки АКЭ как бы "самоперевариваются". Это и обуславливает, скорее всего, гибель опухолевых клеток под влиянием гликозной нагрузки [12].

Хотя механизм гибели клеток при низких значениях pH изучен мало, можно думать, что он универсален для разных клеток, но разные клетки (в том числе клетки разных форм рака) могут различаться по чувствительности к pH. Однако пороговый характер зависимости летального эффекта от величины pH (рис. 5) и специфичность анаэробного гликолиза для опухолевых клеток (даже если он по-разному выражен для разных форм опухолей) позволяют считать, что уменьшение pH в опухолевых клетках при интенсификации анаэробного гликолиза является перспективным методом избирательного их повреждения. Помимо интенсификации гликолиза в опухолевых клетках путем гипергликемии при гипоксии здесь возможны и другие подходы. Одним из них может служить гипертермия, эффективность которой, как известно, резко повышается с уменьшением значений pH [13]. Можно предполагать, что усиление противоопухолевого действия

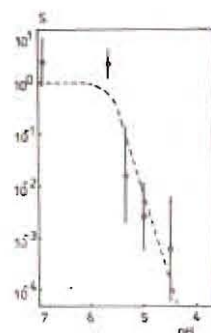


Рис. 5 Влияние инкубации клеток АКЭ при разных значениях pH, создаваемых разными способами (см. текст), на выживаемость этих клеток, оцениваемую по их опухолеобразующей активности. Пороговое значение pH = 5,5.

гипертермии на фоне гипергликемии связано с интенсификацией гликолиза при повышенных температурах и, в конечном счете, с дополнительным уменьшением pH.

Способ оценки гликолитической активности опухолевых клеток путем измерения pH может быть модифицирован для использования в экспериментах и в клинике с целью установления индивидуальных показаний для применения гипергликемии в разных конкретных ситуациях, для выработки наиболее рациональных схем комплексной терапии рака и для ориентировочной оценки ее эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шмакова Н.Л., Лазер К., Ярмоненко С.П., Козубек С., Корогодин В.И. Летальное действие гликозной нагрузки на опухолевые клетки. Препринт ОИИИ, Р19-85-825, Дубна, 1985.
2. Шмакова Н.Л., Лазер К., Ярмоненко С.П., Козубек С., Корогодин В.И. Совместное действие на опухолевые клетки ионизирующих излучений и гликозной нагрузки: сенситивизация, синергия или аддитивность? Препринт ОИИИ, Р19-85-826, Дубна, 1985.
3. Шалот В.С. Биологические аспекты опухолевого роста. М., "Медицина", 1975.
4. Ярмоненко С.П., Шмакова Н.Л., Лазер К., Корогодин В.И. Роль гипоксии в действии гликозной нагрузки на облученные опухолевые клетки. Радиобиология, 1985, 25, 2, с.196-199.
5. Шмакова Н.Л., Лазер К., Ярмоненко С.П., Векслер А.М., Эйдуо Л.Х. Радиомодифицирующее действие гликозной нагрузки на оксигенированные и гипоксические клетки. Мед. радиология, 1984, №12, с.17.
6. Козубек С., Корогодин В.И., Лазер К., Шмакова Н.Л., Ярмоненко С.П. Математическая модель канцерогенного действия клеток асцитной карциномы Эрлиха, вводимых мышам-реципиентам. Препринт ОИИИ, Р19-85-822, Дубна, 1985.
7. Haisman J. The influence of pH on the survival after X-irradiation of cultured malignant cells. Int. J. Rad. Biol., 1980, 27, p.201.

8. Векслер А.М., Кубли Л.Н., Дегтярева О.В., Эйбус Л.Х. Зависимость радиочувствительности клеток фибробластов от pH. Мед. радиология, 1983, №7, с.16.
9. Visser J., Jongelling A., Tauхе Н. Intracellular pH-determination by fluorescence measurement. J. Histochem. Citochem., 1979, 27, p.32.
10. Poole D.T. Intracellular pH of the Ehrlich ascites tumour cells as it is affected by sugars and sugar derivatives. J. Biol. Chem., 1967, 242, p.3731.
- II. Abbere C., Kerckhoff W.D., Vauper P., Muller-Klieser W. Effect of CO₂ and lactic acid on intracellular pH of ascites tumor cells. Respiration Physiology, 1981, 45, p.273.
12. Ardene von M., Reitsner P.G. Übersäuerungsgrenze und pH der Tumorzelle in ihrer Beziehung zur Krebs-Mehrschritt-Therapie. Acta biol. med. germ., 1970, 25, p.483.
13. Overgaard J. Effect of hyperthermia on malignant cells in vivo. Cancer, 1977, 39, p.2637.

Рукопись поступила в издательский отдел
18 ноября 1985 года.

Шмакова Н.Л. и др.

P19-85-827

Роль pH в летальном действии глюкозной нагрузки на опухолевые клетки

Изучали летальное действие на клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) разных pH, создаваемых с помощью глюкозной нагрузки или фосфатных буферов. Эффект оценивали по гибели клеток в условиях *in vitro*, по их опухолеобразующей активности и по радиочувствительности. Установлено, что, независимо от метода уменьшения pH, одинаковым его значениям соответствует одинаковая повреждаемость клеток АКЭ. Летальное действие быстро нарастает при уменьшении pH ниже 5,6. Делается вывод, что в основе механизма летального действия глюкозной нагрузки в гипоксии на клетки АКЭ лежит их "самозащитное". Измерение pH в опухоли предлагается использовать в качестве основного теста при отработке конкретных режимов "глюкозотерапии" в эксперименте и клинике.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований, Дубна 1985

Перевод авторов

Shmakova N.L. et al.

P19-85-827

The Role of pH in Lethal Effect of Glucose Load on Malignant Cells

The lethal effect of various pH values on Ehrlich ascites tumour (EAT) cells has been investigated. Different pH values obtained by means of both glucose load and phosphate buffers. The effect has been investigated by observing cell death *in vitro*, determining cancerogenicity of EAT cells and determining of their radiosensitivity. The results of all methods enabled us to conclude that the same values of pH lead to the same effect on EAT cells independently of the way by which the given pH value was reached. The lethal effect markedly increased when the value of pH was lower than 5,6. It is concluded that the basis of the mechanism of glucose load lethal effect is their "self-acidisation". The measurement of pH in tumours is proposed as a basic test for determining the suitability of the use of hyperglycemia in clinics and for comparison of the efficiency of various modes of treatment.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research, Dubna 1985