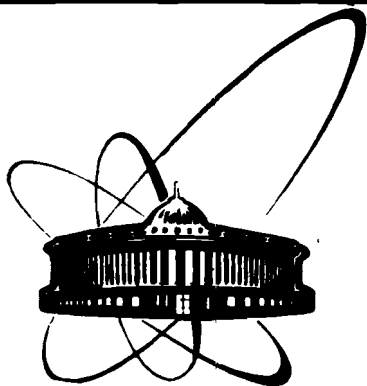


89-256



**ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА**

P19-89-256

**В. И. Корогодин, Н. Л. Шмакова, Б. С. Федоренко <sup>1</sup>,  
Т. Е. Фоменкова, Т. А. Фадеева <sup>2</sup>**

**АНАЭРОБНЫЙ ГЛИКОЛИЗ У КЛЕТОК  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ  
ОПУХОЛЕЙ РАЗНОГО ГИСТОГЕНЕЗА**

Направлено в журнал "Экспериментальная онкология"

---

<sup>1</sup> Институт медико-биологических проблем МЗ СССР,  
Москва

<sup>2</sup> Всесоюзный онкологический научный центр  
АМН СССР, Москва

**1989**

Одним из свойств клеток злокачественных опухолей, отличающим их от клеток нормальных тканей, является способность осуществлять интенсивный анаэробный гликолиз <sup>/1/</sup>. Хотя систематических исследований этого феномена не проводилось, такая точка зрения принята многими авторами <sup>/2-4/</sup>. Считается, что анаэробный гликолиз не только обеспечивает энергетические потребности злокачественных клеток в условиях глубокой гипоксии, но играет также существенную роль в патогенезе рака <sup>/2,4,5/</sup>.

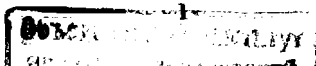
Однако, в соответствии с общепризнанным учением о прогрессии опухолей <sup>/6/</sup>, к числу основных свойств злокачественных опухолей относится лишь их нерегулируемый инвазивный рост, тогда как другие особенности злокачественных клеток (аноплазия, способность к метастазированию, хромосомные аномалии, повышенная способность к гликолизу) могут возникать независимо друг от друга, в процессе прогрессии опухоли. До настоящего времени не ясно, свойствен ли гликолиз доброкачественным опухолям или же способность к интенсивному анаэробному гликолизу является неотъемлемым признаком только злокачественных опухолей, независимо от их гистогенеза и степени прогрессии. Решение этого вопроса важно как в теоретическом плане, так и для совершенствования методик применения искусственной гипергликемии в онкологической практике.

В работах <sup>/7,8/</sup> был описан простой метод оценки способности опухолевых клеток к анаэробному гликолизу *in vitro* путем измерения pH клеточной суспензии при повышенном содержании глюкозы и сопутствующей гипоксии. В случае осуществления активного анаэробного гликолиза pH суспензии в течение одного-полутора часов существенно снижается по сравнению с исходной величиной за счет накопления молочной кислоты <sup>/8/</sup>. Для клеток асцитной карциномы Эрлиха, которые обладают ярко выраженной способностью к анаэробному гликолизу, характерно уменьшение pH в среднем от 7,0 до 5,3-5,0 <sup>/7,8/</sup>.

Этот метод и был использован нами для сравнительной оценки способности к анаэробному гликолизу клеток злокачественных и доброкачественных опухолей разного гистогенеза, индуцированных у крыс ионизирующими излучениями, а также клеток некоторых нормальных тканей.

#### Материал и методики

В работе использовали самок крыс линии **Wistar**. Животных в возрасте 3,5 мес. однократно облучали гамма-лучами <sup>137</sup>Cs (установка "Свет", мощность дозы 7,7 сГр/с), в дозе 4,0 Гр. Опухоли появлялись спустя



6-7 мес. после воздействия излучения. По мере их выявления опухоли извлекали и каждую из них (за исключением опухолей очень малого размера) делили на две части: одну часть использовали для приготовления гистологических препаратов с диагностической целью, а другую - для оценки способности клеток к анаэробному гликолизу. Для этого из каждого образца опухолей путем механического измельчения, фильтрации и центрифугирования приготавливали клеточные суспензии, содержащие по  $2 \cdot 10^6$  -  $1 \cdot 10^7$  клеток в мл физиологического раствора. Суспензии разливали в пенициллиновые флаконы и определяли их pH (с помощью pH-метра "pH-121"). Затем воздух над суспензией в каждом флаконе вытесняли аргоном, флаконы помещали в термостат при  $37^{\circ}\text{C}$  на 15-30 мин (в зависимости от концентрации клеток в суспензии) для создания гипоксии и, не нарушая условий оксигенации, вводили через шприц глюкозу в расчете 1 мг/мл. Спустя 1-1,5 ч инкубации с глюкозой, когда кислотность суспензии достигала плато, вторично определяли значение pH. Таким же образом поступали с образцами нормальных тканей.

### Результаты

Под влиянием облучения у крыс развивались в основном доброкачественные опухоли молочной железы: из 12 выделенных опухолей этого происхождения только 3 были злокачественными. Из-за малых размеров не было проведено морфологического исследования 3 опухолей тимуса, однако макроскопический анализ во всех трех случаях позволил предположить лейкоз лимфоидного типа. Все 4 опухоли легкого оказались злокачественными.

Исходные значения pH суспензий в основном колебались в пределах от 7,0 до 6,7, за исключением опухолей тимуса, в клеточных суспензиях которых исходное значение pH было значительно ниже (6,45-6,00). Результаты опытов приведены в табл. 1. Усредненные значения для pH суспензий злокачественных опухолей разного гистогенеза даны в табл. 2.

Из табл. 1 видно, что в 8 из 9 суспензий клеток, полученных из доброкачественных опухолей молочной железы, при инкубации с глюкозой pH изменялось мало, примерно так же, как и в нормальных тканях, использованных в качестве контроля. Из 3 злокачественных опухолей молочной железы значительное уменьшение pH наблюдалось в 2 случаях. Среднее значение изменения pH для злокачественных опухолей молочной железы составило  $0,58 \pm 0,29$ , а для доброкачественных -  $0,38 \pm 0,08$ .

Из 3 исследованных опухолей тимуса, являющихся лейкоемическими тимомами, 2 характеризовались очень высокой гликолитической активностью. Среднее снижение pH для этих опухолей составило  $1,12 \pm 0,28$ .

Все 4 злокачественные опухоли легкого интенсивно гликолизировали, среднее значение изменения pH для них составило  $0,86 \pm 0,04$ .

Таблица 1. Результаты определения гликолитической активности образцов нормальных тканей, доброкачественных и злокачественных опухолей крыс

Ткань	№ образца ткани	Величина pH суспензии		
		Исходная	После инкубации с глюкозой	Разность
Нормальные ткани				
Легкое	1	7,00	6,60	0,40
	2	7,05	7,05	0,00
Почка	1	7,30	6,95	0,35
	2	7,30	7,10	0,20
Селезенка	1	6,75	6,45	0,30
	2	6,80	6,45	0,35
Костный мозг	1	6,55	6,25	0,30
Доброкачественные опухоли				
Молочная железа	1	7,40	7,00	0,40
	2	6,90	6,60	0,30
	3	7,30	7,00	0,30
	4	7,00	6,70	0,30
	5	6,70	6,60	0,10
	6	7,10	7,00	0,10
	7	7,05	6,70	0,35
	8	7,3	6,60	0,70
	9	6,90	6,05	0,85
Злокачественные опухоли				
Молочная железа	1	6,70	6,70	0,00
	2	6,80	5,95	0,85
	3	7,00	6,10	0,90
Тимус	1	6,45	5,90	0,55
	2	6,40	5,00	1,40
	3	6,05	4,65	1,40
Легкое	1	6,90	6,00	0,90
	2	6,50	5,75	0,75
	3	6,90	6,00	0,90
	4	6,85	5,95	0,90

Проведенное нами по такой же методике определение гликолитической активности клеток нормальных тканей (легкого, почки, селезенки, костного мозга) показало, что в результате инкубации в условиях гипоксии с глюкозой pH клеточных суспензий уменьшается примерно на 0,3 (см. табл. 1).

**Таблица 2.** Средние значения pH для злокачественных опухолей разного гистогенеза

Ткань	Число образцов	Величина pH суспензии		
		Исходная	После инкубации с глюкозой	Разность
Молочная железа	3	6,83±0,09	6,25±0,25	0,58±0,29
Тимус	3	6,30±0,13	5,18±0,37	1,12±0,28
Легкое	4	6,79±0,10	5,93±0,06	0,86±0,04

Как показано в табл. 3, среднее изменение значения pH для всех исследованных нами нормальных тканей составляет  $0,27 \pm 0,05$ , для доброкачественных опухолей -  $0,38 \pm 0,08$ , что не отличается от нормальных тканей ( $p > 0,1$ ), а для злокачественных опухолей -  $0,86 \pm 0,13$ . Различия в изменениях pH между нормальными тканями и доброкачественными опухолями, с одной стороны, и злокачественными опухолями, с другой, статистически высоко достоверны ( $p < 0,01$ ). Это означает, что клетки злокачественных опухолей обладают существенно большей способностью к анаэробному гликолизу по сравнению с клетками доброкачественных опухолей и, конечно, нормальных тканей. Если же сравнивать между собой способность к гликолизу у злокачественных клеток разного гистогенеза (табл. 2), то на основании имеющегося у нас ограниченного материала можно предполагать, что у клеток злокачественных опухолей легкого и тимуса эта способность выражена в несколько большей степени, чем у злокачественных опухолей молочной железы.

**Таблица 3.** Средние значения pH для нормальных тканей, доброкачественных и злокачественных опухолей у крыс

Ткани	Число образцов	Величина pH суспензии		
		Исходная	После инкубации с глюкозой	Разность
Нормальные	7	6,96±0,11	6,69±0,13	0,27±0,05
Доброкачественные опухоли	9	7,07±0,08	6,69±0,10	0,38±0,08
Злокачественные опухоли	10	6,66±0,09	5,80±0,18	0,86±0,13

## Обсуждение

Полученные нами данные, хотя и относятся лишь к небольшой группе опухолей у крыс, позволяют сформулировать гипотезу о роли анаэробного гликолиза в канцерогенезе. Положительной стороной этой гипотезы является возможность прямой экспериментальной проверки основных ее положений.

Если установленные нами различия между клетками злокачественных и доброкачественных опухолей будут иметь место и для широкого круга опухолей разного гистогенеза и происхождения (не только индуцированных, но и спонтанных), а также для животных разных видов, это будет означать, что способность к интенсивному анаэробному гликолизу специфична только для злокачественных опухолей, тогда как способность к неограниченному росту, т.е. "освобождение от контроля" со стороны целостного организма, присуща клеткам как злокачественных опухолей, так и доброкачественных.

Генетическая природа изменений, обуславливающих неограниченный рост злокачественных опухолей, сейчас интенсивно изучается методами молекулярной биологии и в значительной мере выяснена <sup>/9/</sup>. Допустим, что генетические изменения, определяющие способность клеток к неограниченному размножению, идентичны для клеток как злокачественных, так и доброкачественных опухолей. Тогда можно думать, что для возникновения доброкачественных опухолей необходимы и достаточны только такие изменения, и они возникают как "одноэтапные" события, а для возникновения злокачественных опухолей требуется осуществление как этих событий, так и приобретение способности анаэробно сбраживать глюкозу, и они возникают как "двухэтапные" события. Это допущение хорошо согласуется со старыми представлениями о двухэтапности канцерогенеза <sup>/10/</sup> и с общеизвестными различиями в частоте спонтанных возникновений доброкачественных и злокачественных опухолей.

Способность к анаэробному гликолизу может быть связана с различными изменениями в клетках, которые можно условно назвать "эпигенетическими", и может быть следствием как плейотропных эффектов генетической трансформации, так и независимой от них. Если способность к анаэробному гликолизу не связана непосредственно с индукцией онкогенов, то можно ожидать, что в нормальных клетках с достаточно высокой частотой происходят эпигенетические изменения, дающие начало клонам с повышенной гликолитической активностью. Возникновение таких клонов может быть ответственно также за случаи злокачественного перерождения некоторых доброкачественных опухолей.

Можно ожидать, что частота индукции злокачественных клеток физическими и химическими онкогенами, а также методами генной инженерии,

в линиях нормальных клеток с повышенной активностью анаэробного гликолиза (если таковые удастся получить), будет значительно выше, чем в линиях клеток, которым анаэробный гликолиз не свойствен. Естественно, что в таком случае особый интерес будет представлять выяснение природы генетических или эпигенетических событий, обуславливающих активацию в клетках млекопитающих ферментативных систем и регуляторных механизмов, обеспечивающих осуществление интенсивного анаэробного гликолиза.

Следует подчеркнуть, что сейчас еще далеко не ясно, насколько универсальны различия в анаэробном гликолизе между доброкачественными и злокачественными опухолями. Даже в наших экспериментах среди девяти опухолей молочной железы, идентифицированных как "доброкачественные", у двух (образцы № 8 и 9) наблюдался повышенный анаэробный гликолиз, а у одной из трех "злокачественных" (образец № 1) анаэробный гликолиз вообще отсутствовал (см. табл. I). Неизвестно, были ли здесь ошибки в идентификации, или у двух доброкачественных опухолей уже началась злокачественная трансформация, или же клетки одного из образцов злокачественных опухолей были повреждены в ходе эксперимента и утратили способность к гликолизу. Не допускают однозначной трактовки и единичные литературные данные, которые, казалось бы, относятся к обсуждаемой проблеме. Так, в работе /11/ не было обнаружено связи между интенсивностью аэробного гликолиза и злокачественностью некоторых линий перевиваемой опухоли, — но анаэробный гликолиз у этих линий не изучался. Отсутствие же прямой связи между интенсивностью аэробного и анаэробного гликолиза следует из работы /12/, где показано, что три клона клеток млекопитающих, не различающиеся между собой по аэробному гликолизу, в то же время значительно отличались друг от друга по интенсивности гликолиза в анаэробных условиях, причем клон, обладавший наибольшей канцерогенностью, более интенсивно ображивал глюкозу (в отсутствие кислорода), чем два других клона.

Всё это, вместе взятое, и заставляет рассматривать наши данные лишь как предварительные, а наши представления — лишь как рабочую гипотезу, подлежащую экспериментальной проверке.

Авторы благодарят П.Н.Лобачевского за прочтение рукописи и ценные критические замечания.

#### Литература

1. Warburg O., Posener K., Negelein E. *Über den stoffwechsel der Carcinomzelle.* — *Radhem. Z.*, 1924, v. 152, S. 309-317.
2. Шапот В.С. Биохимические аспекты опухолевого роста. М., Медицина, 1975, 305 с.

3. Burk D., Woods M., Hunter J. *On the significance of glycolysis for cancer growth.* — *J. Natl. Cancer Inst.*, 1967, v. 38, p. 839-846.
4. Александров Н.Н., Савченко Н.Е., Фрадкин С.З., Жаврид Э.А. Применение гипертермии и гипергликемии при лечении злокачественных опухолей. М., Медицина, 1980, 210 с.
5. Leighoton J. *A new concept in the destruction of normal tissue by cancer.* — In: *Cancer cells in culture.* Ed. by Katsuta H., Acad. Press, N.-Y., 1968, p. 143-152.
6. Foulds L. *Tumor development.* — Acad. Press, N.-Y., 1969.
7. Шмакова Н.Л., Лазер К., Ушанова Г., Фадеева Т.А. Проблема усиления биологического действия ионизирующих излучений. Глюкоза как средство повышения радиочувствительности клеток асцитной карциномы Эрлиха. — *Радиобиология*, 1984, т. 24, № 4, с. 172-176.
8. Shmakova N.L., Laser K., Pomenkova T.E., Korogodin V.I., Kozubek S., Yarmonenko S.P. *Lethal effect of glucose load on malignant cells.* — *Neoplasma*, 1987, v. 34, p. 727-734.
9. Агеенко А.И. Онкогены и канцерогенез. М., Медицина, 1986, 250 с.
10. Беренблум И. Канцерогенез и патогенез опухолей. — В кн.: *Успехи в изучении рака.* М., Медгиз, 1956, №2, с. 9-57.
11. Franchi A., Silvestre P., Pouyssegur J. *A genetic approach to the role of energy metabolism in the growth of tumor cells: tumorigenicity of fibroblast mutants deficient either in glycolysis or in respiration.* — *Int. J. Cancer*, 1981, v. 27, p. 819-827.
12. Sanford K.K., Westfall B.B. *Growth and glucose metabolism of high and low tumor-producing clones under aerobic and anaerobic conditions in vitro.* — *J. of the National cancer institute*, 1969, v. 42, p. 953.

Рукопись поступила в издательский отдел  
13 апреля 1989 года.

### НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

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

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 к.
Д12-84-599	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 к.
Д11-85-791	Труды Международного совещания по аналитическим вычислениям на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1985.	4 р. 00 к.
Д13-85-793	Труды XII Международного симпозиума по ядерной электронике. Дубна, 1985.	4 р. 80 к.
Д4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1985.	3 р. 75 к.
Д3,4,17-86-747	Труды V Международной школы по нейтронной физике Алушта, 1986.	4 р. 50 к.
—	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984. (2 тома)	13 р. 50 к.
Д12-86-668	Труды VIII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1986. (2 тома)	7 р. 35 к.
Д9-87-105	Труды X Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1986. (2 тома)	13 р. 45 к.
Д7-87-68	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Дубна, 1986.	7 р. 10 к.
Д2-87-123	Труды Совещания "Ренормгруппа - 86". Дубна, 1986.	4 р. 45 к.
Д4-87-692	Труды Международного совещания по теории малочастичных и кварк-адронных систем. Дубна, 1987.	4 р. 30 к.
Д2-87-798	Труды VIII Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1987.	3 р. 55 к.
Д14-87-799	Труды II Международного симпозиума по проблемам взаимодействия мюонов и пионов с веществом. Дубна, 1987.	4 р. 20 к.
Д17-88-95	Труды IV Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1987.	5 р. 20 к.

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

Корогодин В.И. и др.

P19-89-256

Анаэробный гликолиз у клеток злокачественных и доброкачественных опухолей разного гистогенеза

Способность к анаэробному гликолизу клеток нормальных и опухолевых тканей крыс определяли путем измерения pH клеточной суспензии до и после инкубации в растворе глюкозы при гипоксии. Установлено, что анаэробный гликолиз ярко выражен у клеток злокачественных опухолей разного гистогенеза и очень слабо — у клеток доброкачественных опухолей, которые в этом отношении не отличаются от клеток нормальных тканей. Высказывается гипотеза, согласно которой активация системы анаэробного гликолиза, наряду с индукцией онкогенов, является необходимым условием злокачественной трансформации клеток. Обсуждаются некоторые следствия из этой гипотезы.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1989

Перевод авторов

Korogodin V.I. et al.

P19-89-256

Anaerobic Glycolysis in Cells of Malignant and Non-Malignant Tumours of Different Histogenesis

The ability of rat tumour tissues to anaerobic glycolysis has been determined by means of the measurement of cell suspension pH values before and after incubation with glucose in anoxic conditions. It has been established that the anaerobic glycolysis is markedly expressed in malignant tumour cells of different histogenesis and weakly — in non-malignant tumour cells which in this respect do not differ from normal tissues. A hypothesis is proposed according to which the activation of anaerobic glycolysis as well as the induction of oncogenes is necessary condition of malignant transformation of cells. Some consequences of this hypothesis are considered.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1989