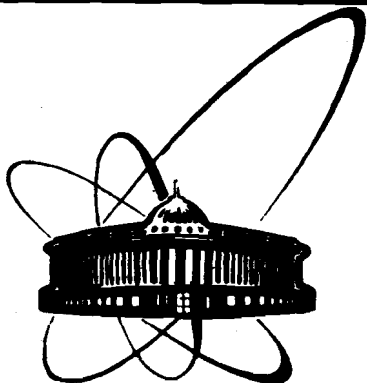


89-307



**СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

Λ 68

P19-89-307

П. Н. Лобачевский, Ю. В. Оводков

**ПРИМЕНЕНИЕ рН-МЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГЛИКОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК**

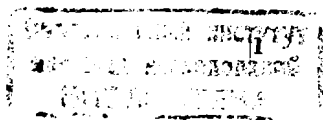
**Теоретические и экспериментальные
основы подхода**

1989

Как известно, одной из особенностей метаболизма клеток злокачественных опухолей является их высокая потенциальная способность к анаэробному гликолизу - утилизации глюкозы в отсутствие кислорода с образованием лактата /1-3/. Интенсивности анаэробного гликолиза клеток разных опухолей существенно различаются. В ряде случаев наблюдается корреляция между интенсивностью анаэробного гликолиза и скоростью роста опухоли /4/, что свидетельствует о существенной роли анаэробного гликолиза в злокачественном росте. Выделение лактата при анаэробном гликолизе приводит к значительному закислению окружающей клетки среды, что в ряде случаев вызывает гибель клеток. Анализ указанного явления привел многих авторов к заключению о возможности использования гипергликемии в качестве терапевтического средства для лечения злокачественных опухолей, главным образом, в комбинации с облучением и другими воздействиями на опухоль /3,5-7/. Исследованию механизмов терапевтического действия гипергликемии посвящено много работ /6-9/. Несомненно, что решающую роль в этом процессе играют самозакисление опухолевой ткани за счет образования лактата и нарушение микроциркуляции крови в опухоли, что способствует закислению из-за задержки оттока лактата. Сенсбилизация опухоли к облучению в сочетании с гипергликемией может быть обусловлена подавлением при низких значениях pH репарационных процессов в клетке.

Очевидно, что успех применения гипергликемии в качестве терапевтического средства в значительной мере будет определяться тем, насколько у клеток опухоли, подвергаемой воздействию, выражена способность к анаэробному усвоению глюкозы. Между тем, экспериментальные данные по интенсивности анаэробного гликолиза злокачественных опухолей весьма ограничены, сравнение результатов разных работ затруднено вследствие применения авторами различных методик и различной нормировки исследуемого показателя.

В свете вышесказанного цель настоящего исследования состояла в разработке методики для определения интенсивности анаэробного гликолиза клеток злокачественных опухолей. Основными требованиями к разрабатываемому подходу были следующие: нормировка исследуемого показателя, обеспечивающая возможность сравнения результатов, получаемых на разном материале и в разных лабораториях; быстрота и невысокая трудо-



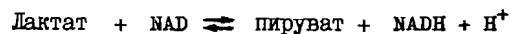
емкость определения, обеспечивающие возможность анализа большого количества образцов. В дальнейшем предполагалось использовать разработанный подход для исследования анаэробного гликолиза как экспериментальных опухолей животных, так и опухолей человека.

НОРМИРОВКА ИССЛЕДУЕМОГО ПОКАЗАТЕЛЯ

Интенсивность анаэробного гликолиза определяют количеством лактата, продуцируемого за единицу времени. При изучении гликолиза в кусочках опухолевой ткани эту величину нормируют, как правило, на сухой вес препарата или на количество белка $^{4-10}$. Нормировку на количество клеток применяют обычно при определении гликолиза в культуре клеток 11 . Нормировка гликолитической активности на количество белка или на сухой вес может вносить, как нам кажется, существенную погрешность в результат. Это связано с тем, что практически невозможно получить образец ткани из опухоли, содержащий только опухолевые клетки. В нем всегда присутствуют клетки нормальной ткани, клетки крови, некротизированные участки опухоли. Доля, которую вносят жизнеспособные опухолевые клетки в общий сухой вес или в общий белок образца, может неконтролируемо меняться от одного материала к другому. Следовательно, будет искажена и нормируемая таким образом гликолитическая активность, поскольку в принципе ее нужно нормировать на "опухолевый" сухой вес или на количество "опухолевого" белка. С учетом этих обстоятельств в предлагаемом нами методе гликолитическую активность определяли в суспензии опухолевых клеток, а нормировку производили на количество жизнеспособных клеток.

ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛАКТАТА

Как правило, концентрацию лактата в среде определяют биохимическим методом, основанным на следующей реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой:



Определяя фотометрически количество NADH, судят о количестве лактата. Существует ряд других методов определения лактата: манометрический, радиоизотопный, электрохимический. Однако для быстрого анализа большого количества образцов эти методы слишком трудоемки и не всегда поддаются стандартизации. Поэтому мы предложили более простой способ, основанный на закислении лактатом среды культивирования клеток. Как было показано 12 , транспорт лактата через плазматическую мембрану клеток сопряжен с транспортом протонов. Поэтому выделение клетками в окружающую среду определенного количества лактата сопро-

вождается выделением эквивалентного количества протонов. Этот процесс вызывает снижение pH среды, измеряя которое можно определить приращение концентрации протонов и, соответственно, количество продуцируемого клетками лактата.

Применение этого метода для определения количества лактата требует учета следующих важных моментов. Во-первых, изменение pH среды, в которой суспендированы клетки, может быть обусловлено другими продуктами жизнедеятельности клеток, главным образом углекислым газом. Для определения лактата указанным методом нужно создать условия, когда закисление обусловлено только лактатом. Во-вторых, величина изменения pH будет определяться не только количеством продуцируемого лактата, но и буферной емкостью раствора, в котором суспендированы клетки. Для учета этого фактора буферная емкость раствора должна быть известна и контролируема. В предлагаемом нами методе это осуществлялось следующим образом. Буферные свойства сред и растворов для культивирования клеток определяются, как правило, концентрацией бикарбоната, который уравнивается углекислым газом воздуха или заданной концентрации. Такая буферная система непригодна для наших целей, поскольку ее буферные свойства зависят от концентрации углекислого газа. Поэтому мы изучали гликолитическую активность клеток в сбалансированном солевом растворе, не содержащем бикарбоната. Буферную емкость раствора создавали, добавляя в него NEPES* в известной концентрации. Эта концентрация определялась, главным образом, концентрацией клеток исследуемой суспензии так, чтобы получить оптимальную величину и скорость снижения pH. Буферный сбалансированный солевой раствор предварительно калибровали, определяя зависимость pH от приращения количества ионов водорода. Калибровочная кривая такого раствора, содержащего 3,3 мМ NEPES, приведена на рис. 1.

Совпадение кривых 1 и 2 (рис. 1), полученных при калибровке раствора соответственно соляной и молочной кислотами, указывает на то, что калибровку используемых растворов допустимо производить соляной кислотой и по полученной таким образом кривой по изменению pH от pH₁ до pH₂ определять приращение концентрации лактата $\Delta c = c_2 - c_1$. Кривые калибровки растворов с другими концентрациями NEPES отличаются от вышеприведенной соответствующим сжатием или растяжением оси абсцисс. Это позволяет пользоваться одной калибровочной кривой для растворов с разной концентрацией NEPES, умножая полученную величину Δc на соответствующий коэффициент.

Как указывалось выше, снижение pH в клеточной суспензии может быть обусловлено поступлением в среду углекислого газа - продукта ды-

*NEPES - 2-N-гидроксиэтилпиперазин-2-N'-этансульфоновая кислота.

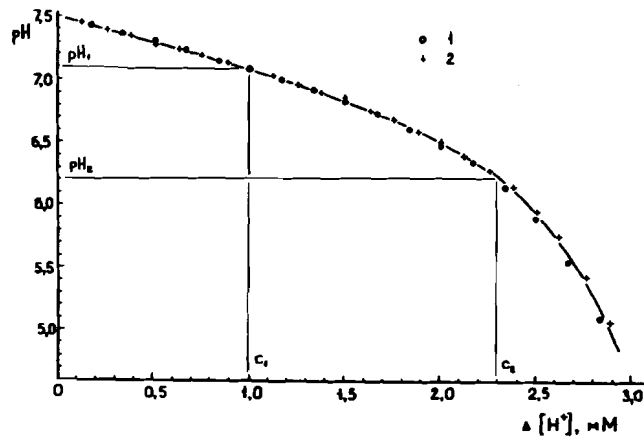


Рис.1. Калибровочный график буферного раствора, содержащего 3,3 мМ NaH_2PO_4 , полученный при титровании соляной кислотой (кривая 1) и молочной кислотой (кривая 2). По оси абсцисс - приращение концентрации ионов водорода, мМ; по оси ординат - pH.

хания клеток. Однако это обстоятельство не играет существенной роли в случае исследования гликолитической активности в анаэробных условиях, когда дыхание у клеток почти полностью отсутствует. Для создания анаэробных условий клетки инкубировали в герметичных камерах, целиком (без пузырьков воздуха) заполненных суспензией клеток.

На рис.2 изображена типичная кривая снижения pH в суспензии гликолизующих клеток (кривая 1). В эксперименте использованы клетки асцитного рака Эрлиха линии ELD. Инкубирование на начальном этапе проводили в сбалансированном растворе, не содержащем глюкозы. В таких условиях клетки в течение 10-30 минут расходуют на дыхание практически весь растворенный кислород, используя в качестве источника энергии эндогенные субстраты. Проведенные нами измерения показывают, что при концентрации клеток порядка 10^6 кл/мл через 30 минут инкубирования суспензии в герметичной камере парциальное давление кислорода уменьшается почти в 100 раз. Этот процесс сопровождается выделением углекислого газа и незначительным снижением pH суспензии (начальный участок кривой 1 на рис.2). Стабилизация pH при инкубировании суспензии без глюкозы (кривая 3 на рис.2) свидетельствует о почти полном прекращении дыхания вследствие истощения кислорода. В таких условиях все промежуточные переносчики электронов в системе энергетического метаболизма клеток переходят в восстановленное состояние.

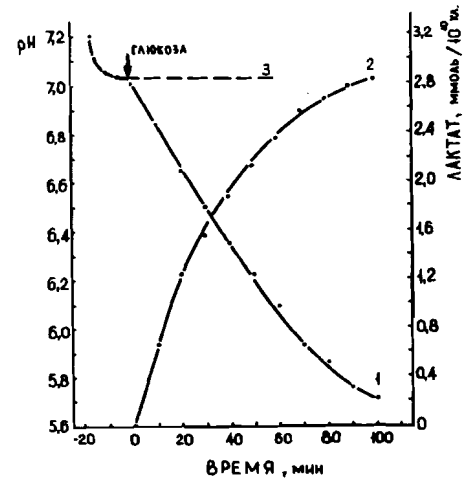


Рис.2. Кривые снижения pH (1 и 3) и накопления лактата (2) в суспензии инкубируемых клеток. 1 - при добавлении 20 мМ глюкозы, 3 - без глюкозы.

В момент времени, когда снижение pH при инкубировании без глюкозы практически прекращается (на рис.2 время = 0), в суспензию клеток добавляли глюкозу. Единственным акцептором электронов в клетке является в этом случае образующийся в результате гликолиза пируват, который, восстанавливаясь, превращается в лактат. Это обуславливает дальнейшее снижение pH в суспензии (рис.2). В рассматриваемых нами условиях энергетический метаболизм клетки представляет собой в основном только гликолиз, протекающий по анаэробному пути, то есть с образованием лактата, поступлением которого и обусловлено снижение pH в суспензии клеток.

Создание гипоксических условий в суспензии гликолизующих клеток важно еще и по другой причине. Известно, что клетки многих злокачественных опухолей утилизируют глюкозу по анаэробному пути и в аэробных условиях, но интенсивность этого процесса меньше, чем в анаэробных условиях. В присутствии кислорода способность клеток к анаэробному пути усвоения глюкозы реализуется не полностью. Поэтому применение гипоксических условий позволяет определить показатель, характеризующий потенциальную способность клеток к анаэробному гликолізу. В работе [13] одновременно определяли биохимически концентрацию лактата и снижение pH в суспензии анаэробно гликолизующих клеток. Мы провели титрование кислотой буферного раствора, аналогичного использованному в данной работе, и построили для него калибровочную кривую. На основании этой кривой мы рассчитали изложенным выше методом концентрации лактата в суспензии гликолизующих клеток, используя приведенные в работе [13] данные по снижению pH. На рис.3 по оси абсцисс отложены значения концентрации лактата в суспензии гликолизующих клеток, определенные биохимическим методом, а по оси ординат - соответствующие величины, рассчитанные нами вышеприведенным методом на основании данных по снижению pH в той же суспензии гликолизующих клеток. Аппроксимация приведенных результатов линейной зависимостью $y = kx + b$ дает следующие значения для тангенса угла наклона

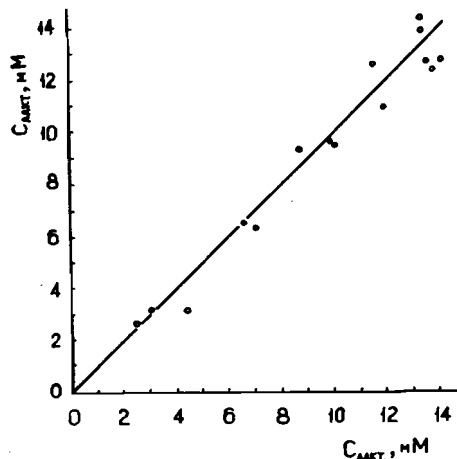


Рис.3. Соотношение между значениями концентрации лактата, определенными биохимическим методом (ось абсцисс) и рассчитанными по величине снижения pH (ось ординат).

прямой k и для точки пересечения прямой с осью ординат b :
 $k = 0,988 \pm 0,114$, $b = 0,173 \pm 0,440$.
 Величина k достоверно не отличается от 1, а величина b достоверно не отличается от 0. Таким образом, результаты регрессионного анализа показывают совпадение величин концентрации лактата, определенных биохимическим методом и по снижению pH в суспензии гликолизирующих клеток. Этот факт свидетельствует о приемлемости предлагаемого нами метода для измерения концентрации лактата в суспензии гликолизирующих клеток и определения их гликолитической активности.

Преимуществом предлагаемого метода является простота, быстрота определения концентрации лактата, возможность получения отчета в любой момент времени, что по-

зволяет подробно изучать кинетику накопления лактата. Непрерывность наблюдения за кинетикой накопления лактата дает возможность исследовать влияние различных факторов, например pH, и веществ на гликолитическую активность клеток.

На рис.2 изображена кривая накопления лактата в суспензии гликолизирующих клеток асцитного рака Эрлиха линии ELD (кривая 2), рассчитанная на основе кривой снижения pH, представленной на этом же рис. (кривая 1), и нормированная на концентрацию клеток. Анализ такой кривой позволяет определить интенсивность анаэробного гликолиза, как скорость поступления лактата в среду, нормированную на концентрацию клеток. В данном случае эта величина составляет на начальном участке кривой $10,4$ нмоль на 10^8 клеток за секунду.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложена методика для определения интенсивности анаэробного гликолиза клеток злокачественных опухолей. Предлагаемый подход основан на измерении снижения pH в суспензии гликолизирующих клеток, полученных из опухоли, и удовлетворяет всем условиям, сформулированным в начале настоящей работы. Измерение гликолитической активности не требует дорогостоящих реактивов и оборудования

и осуществляется с помощью pH-метра и стандартных электродов. Методика позволяет определить гликолитическую активность через 10-15 минут после добавления в суспензию глюкозы. Непрерывность наблюдения за кинетикой накопления лактата дает возможность исследовать влияние различных факторов и веществ на гликолиз.

Авторы выражают благодарность Н.Л.Шмаковой за предоставленные для экспериментов суспензии клеток асцитного рака Эрлиха.

ЛИТЕРАТУРА

1. Warburg O. et al. *Biochem. Z.*, 1924, v.152, s.309-344.
2. Cori C.F., Cori G.T. *J. Biol. Chem.*, 1925, v.64, p.11-12.
3. Шапот В.С. Биохимические аспекты опухолевого роста. М.: Медицина, 1975.
4. Burk D., Woods M., Hunter J. *J. Natl. Can. Inst.*, 1967, v.38, p.839-863.
5. Ardenne von M. *Selective Verstärkerung einer premaren Krebszellenschädigung als Fundamentalprozess der Krebs-Mehrschritt-Therapie*. Turin Lecture, 1969.
6. Александров Н.Н., Савченко Н.Е., Фрадкин С.З., Жаврид Э.А. Применение гипертермии и гипергликемии при лечении злокачественных опухолей. М.: Медицина, 1980.
7. Ярмоненко С.П., Шапот В.С., Осинский С.П. *Экспериментальная онкология*, 1984, т.6, №2, с.3-8.
8. Шмакова Н.Л. и др. *Экспериментальная онкология*, 1987, т.9, №1, с.57-65.
9. Козин С.В., Дюскалиев Ж.Д., Ярмоненко С.П. *Медицинская радиология*, 1984, т.29, №8, с.31-37.
10. Belt J.A. et al. *Biochemistry*, 1979, v.18, n.16, p.3506-3511.
11. Уэннер Ч.Е., Томеи Л.Д. Фенотипическая экспрессия злокачественной трансформации и ее связь с энергетическим обменом. В кн.: *Трансформированная клетка*. Под ред. И.Л.Камерона, Т.Б.Цула. Киев: Наукова думка, 1985, с.158-175.
12. Spencer T.L., Lehninger A.L. *Biochem. J.*, 1976, v.154, n.2, p.405-414.
13. Poole D.T. *J. Biol. Chem.*, 1967, v.242, n.16, p.3731-3736.

Рукопись поступила в издательский отдел
3 мая 1989 года.