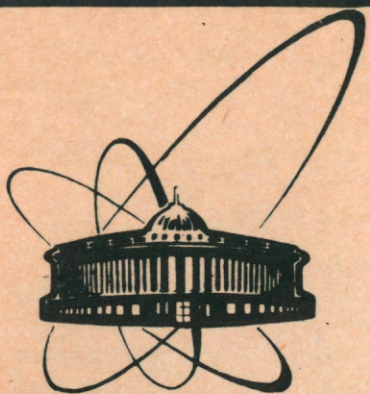


89-465



сообщения  
объединенного  
института  
ядерных  
исследований  
дубна

Л 68

P19-89-465

П. Н. Лобачевский, Ю. В. Оводков, А. Л. Карповский

ПРИМЕНЕНИЕ рН-МЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ГЛИКОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК  
Исследование анаэробного гликолиза клеток  
экспериментальных опухолей животных

1989

Лобачевский П.Н., Оводков Ю.В.,  
Карповский А.Л.

P19-89-465

Применение рН-метрии для определения  
гликолитической активности клеток.

Исследование анаэробного гликолиза клеток  
экспериментальных опухолей животных

Исследована интенсивность анаэробного гликолиза ряда экспериментальных опухолей животных с помощью методики измерения снижения рН в суспензии гликолизирующих клеток. Скорость накопления лактата в суспензии гликолизирующих клеток уменьшалась при снижении рН. Проведен анализ выявления закономерностей анаэробного гликолиза.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1989

Перевод авторов

Lobachevskij P.N., Ovodkov Yu.V.,  
Karpovskij A.L.

P19-89-465

pH-Measurement Application for Determination  
of Cell Glycolytic Activity. The Investigation  
of Anaerobic Glycolysis of Experimental Tumor

The rate of anaerobic glycolysis of experimental tumor has been investigated by means of pH-measurement in suspension of glycolysing cells. The rate of lactate accumulation in cell suspension of the glycolysing cells is reduced with pH decreasing. The analysis of observed characteristics of the anaerobic glycolysis was made.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1989

## ВВЕДЕНИЕ

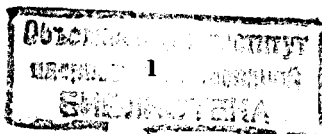
Высокая потенциальная способность клеток злокачественных опухолей к анаэробному гликолизу послужила основанием для разработки методов терапии опухолей с применением гипергликемии /I-4/. В основе терапевтического действия глюкозной нагрузки лежит самозакисление опухолевой ткани за счет образования лактата в процессе анаэробного гликолиза и задержки оттока лактата из опухоли в результате нарушения микроциркуляции крови /3-7/. Очевидно, что успех применения гипергликемии в первую очередь будет определяться тем, насколько у клеток опухолей, подвергаемых воздействию, выражена способность к анаэробному усвоению глюкозы. Между тем экспериментальные данные по интенсивности анаэробного гликолиза злокачественных опухолей животных и человека весьма ограничены, сравнение результатов разных работ практически невозможно вследствие использования авторами различных методик и различной нормировки исследуемого показателя.

Ранее нами была предложена методика исследования накопления лактата, основанная на измерении снижения рН в суспензии гликолизирующих клеток /8/. Методика позволяет непрерывно следить за накоплением лактата и в любой момент времени определять гликолитическую активность клеток. Настоящая работа посвящена исследованию с помощью этой методики некоторых закономерностей анаэробного гликолиза ряда экспериментальных опухолей животных и оценке точности предложенной методики.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах по определению интенсивности анаэробного гликолиза использовали клетки рака Эрлиха линии ELD, аспитную форму, культивируемую в брюшной полости, и солидную форму, прививаемую в бедро мышей (сва\*с57b1) F1, и клетки мышинной лимфомы L5178Y, культивируемые *in vitro*.

Суспензии клеток для исследования гликолитической активности солидных опухолей получали ферментативной обработкой кусочков опухоли. Ферменты (коллагеназа техническая-0,2%, ронидаза, лечебный препарат-0,1%, дезоксирибонуклеаза-0,01%) растворяли в питательной среде сле-



дукщего состава: среда I99 - 80%, сыворотка крови крупного рогатого скота - 20% с добавлением глюкозы до 5 г/л и антибиотиков. Измельченную опухолевую ткань инкубировали в ферментативной среде при 37°С в течение 2-3 часов. Затем клетки отмывали от ферментативной среды.

Для определения интенсивности анаэробного гликолиза по описанной ранее методике клетки инкубировали в сбалансированном солевом растворе без бикарбоната, содержащем I - 20 мМ НЕРЕС для создания заданной буферной емкости, в герметично закрытых камерах при 37°С.

После добавления в камеру глюкозы до 20 мМ проводили непрерывное измерение pH с помощью встроенных в камеру электродов (измерительного ЭИС-43-07 и вспомогательного ЭВМ-1М1). Затем с помощью калибровочного графика по величине снижения pH определяли поступление лактата в среду.

Предварительно мы исследовали влияние указанной выше ферментативной обработки на скорость накопления лактата в суспензии гликолизирующих клеток. Обработка ферментативной средой суспензии асцитных клеток ELD не влияла на скорость снижения pH. Исследование накопления лактата в суспензиях, полученных из солидной опухоли, показало,

что при нормировке на количество жизнеспособных клеток скорости накопления лактата не отличаются для суспензий, полученных ферментативным способом и путем механического дробления опухоли. В дальнейшем мы использовали только ферментативный способ, поскольку он обеспечивает более высокий, по сравнению с механическим, выход клеток. Доля жизнеспособных клеток при ферментативном получении суспензии составляет 50 - 80%, что также существенно превышает соответствующую величину для механического способа - 20 - 40%.

Выход жизнеспособных клеток зависел от возраста опухолей и составлял от I до  $30 \cdot 10^6$  клеток на I г ткани. Концентрацию клеток в

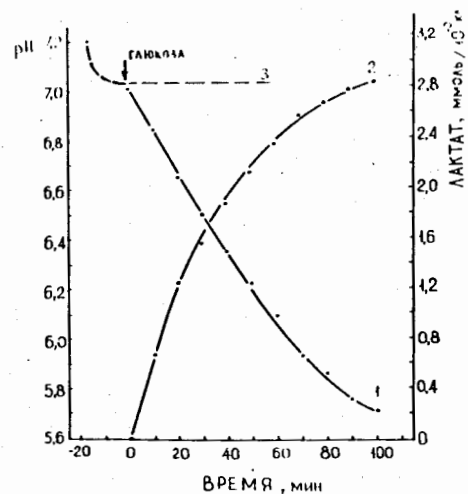


Рис. I. Кривые снижения pH (I и 3) и накопления лактата (2) в суспензии инкубируемых клеток ELD. I - при добавлении 20 мМ глюкозы, 3 - без добавления глюкозы.

суспензии и долю жизнеспособных клеток подсчитывали в камере Горяева, используя окрашивание трипановым голубым и метод фазового контраста.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. I изображена типичная кривая снижения pH в суспензии гликолизирующих клеток ELD (кривая I) и рассчитанная на ее основе кривая, отражающая кинетику накопления лактата и нормированная на концентрацию клеток (кривая 2). Как видим, концентрация лактата сначала нарастает линейно, затем скорость поступления лактата в культуральную среду уменьшается. Дальнейшее инкубирование приводит к выходу кривой на плато. Наиболее вероятными причинами уменьшения скорости поступления лактата в культуральную среду могут быть подавление анаэробного гликолиза при снижении pH и гибель клеток. Для проверки этих предположений мы провели следующие эксперименты. Параллельно изучали накопление лактата в двух суспензиях: одна содержала  $4,2 \cdot 10^6$  кле-

ток/мл и имела концентрацию НЕРЕС 19 мМ, другая соответственно  $1,7 \cdot 10^7$  клеток/мл и 4 мМ НЕРЕС. Результаты этого эксперимента приведены на рис. 2. В суспензии, имеющей большую буферную емкость и меньшую концентрацию клеток, снижение pH незначительно: 0,4 ед. pH за 150 мин (кривая I). Накопление лактата при этом происходит линейно со скоростью  $11 \pm 2$  нмоль/ $10^8$  кл.·с (кривая 3). В суспензии с меньшей буферной емкостью и большей концентрацией клеток pH снижается на 1,3 ед. за 20 мин (кривая 2), однако кривая накопления лактата уже через 30 мин выходит на плато (кривая 4). На линейном участке этой кривой скорость накопления лактата составляет  $9 \pm 1$  нмоль/ $10^8$  кл.·с, что практически не от-

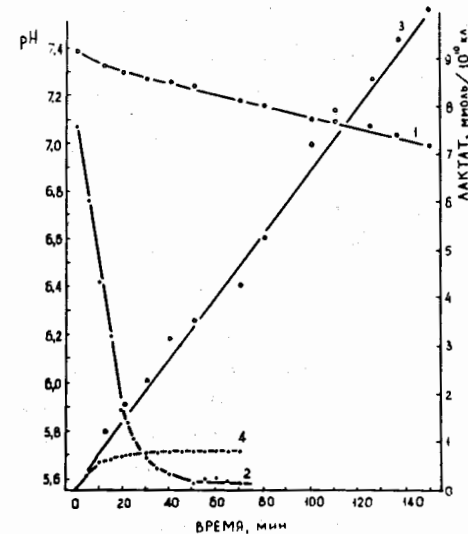


Рис. 2. Кривые снижения pH (I и 2) и накопления лактата (3 и 4) в суспензиях гликолизирующих клеток ELD с разной концентрацией клеток и разной буферной емкостью среды. I, 3 -  $4,2 \cdot 10^6$  кл./мл, 19 мМ НЕРЕС, 2, 4 -  $17 \cdot 10^6$  кл./мл, 4 мМ НЕРЕС.

личается от соответствующей величины для предыдущего случая. Отклонение кривой накопления лактата от линейной зависимости происходит при  $pH = 6,6$ . В первом случае  $pH$  не снижается до таких величин, что и обеспечивает в этом случае линейность накопления лактата.

Результаты этого эксперимента прямо указывают на то, что по крайней мере одной из причин уменьшения скорости поступления лактата в культуральную среду является снижение  $pH$ . На рис.3 скорость накопления лактата изображена в зависимости от величины  $pH$ . Граничным значением  $pH$ , до которого накопление лактата происходит с постоянной скоростью, является величина  $pH = 6,6$ , а при величинах  $pH = 5,7 - 5,8$  скорость накопления лактата уменьшается более чем на порядок, поэтому при этих значениях  $pH$  накопления лактата практически не происходит. Кривую снижения скорости накопления лактата при уменьшении  $pH$  можно разбить (в полулогарифмических координатах) на два линейных участка. Интерпретация такой формы указанной кривой будет дана ниже.

Приведенные результаты не позволяют, однако, заключить, обратимо или необратимо подавляется накопление лактата при снижении  $pH$ . Обратимое подавление поступления лактата в культуральную среду при уменьшении  $pH$  может быть обусловлено хорошо известным и описанным в литературе влиянием  $pH$  на транспорт лактата через клеточную мембрану<sup>9,10</sup>.

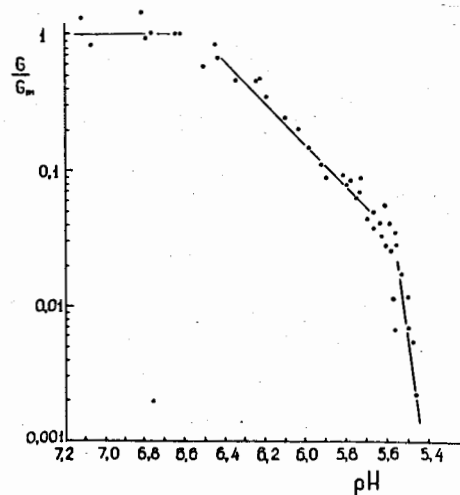


Рис.3. Зависимость относительной скорости накопления лактата в суспензии гликолизирующих клеток от  $pH$  среды.

Подавление при снижении внешнего  $pH$  транспорта лактата через клеточную мембрану в окружающей среде вызывает увеличение его концентрации внутри клетки, снижение внутриклеточного  $pH$  и ингибирование ферментов гликолиза. Необратимое подавление накопления лактата может быть обусловлено гибелью клеток. Для выяснения того, какой процесс: гибель клеток или ингибирование анаэробного гликолиза обуславливает подавление накопления лактата, мы провели следующие эксперименты.

На определенном этапе инкубирования суспензии гликолизирующих клеток проводили нейтрализацию кислых значений  $pH$  путем добавления в

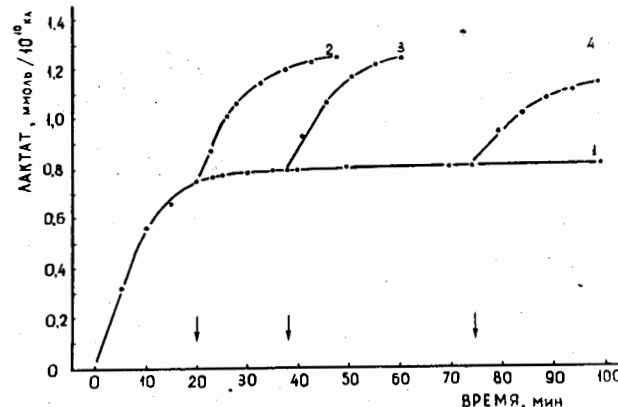


Рис.4. Накопление лактата в суспензии гликолизирующих клеток: I — при непрерывном инкубировании, 2,3 и 4 — после нейтрализации кислых значений  $pH$  в моменты времени, указанные стрелками. Значения  $pH$  перед нейтрализацией составили для кривых 2,3 и 4 соответственно 6,2, 5,6 и 5,6.

среду щелочи. Это приводило к полному или частичному восстановлению скорости накопления лактата в тех случаях, когда она отличалась от максимальной. Степень восстановления скорости накопления лактата может служить мерой обратимости процесса подавления накопления лактата при снижении  $pH$ . Если причиной необратимого подавления считать гибель клеток, то отношение скорости после нейтрализации кислых  $pH$  к максимальной скорости отражает выживаемость клеток в данных условиях. На рис.4 приведены результаты эксперимента. Отношение скорости накопления лактата на линейном участке после нейтрализации к начальному значению этой величины составляет для кривых 2,3 и 4 соответственно 0,78, 0,62, 0,38. Как видно из приведенных данных, чем ниже значение  $pH$ , при котором проводили нейтрализацию, тем меньше степень восстановления скорости накопления лактата, то есть меньше выживаемость клеток. При снижении  $pH$  до величины 6,2 степень восстановления скорости накопления лактата составляет 0,78 (рис.4). При этом значении  $pH$  скорость накопления лактата составляет 0,25 от максимальной (рис.3). Это означает, что в интервале выше указанного значения  $pH$  происходит в основном обратимое подавление скорости накопления лактата, а гибель клеток незначительна. Дальнейшее снижение  $pH$ , а также инкубирование клеток при низком, но не изменяющемся в силу подавления накопления лактата, значении  $pH$  приводит к увеличению необрати-

мого компонента, то есть к гибели клеток. При значениях pH, меньших 5,6, гибель клеток вносит существенный вклад в подавление накопления лактата. Эти результаты позволяют интерпретировать двухкомпонентный характер кривой, приведенный на рис.3 и отражающий зависимость скорости накопления лактата от величины pH. В интервале pH от 6,6 до 5,6 происходит главным образом обратимое подавление анаэробного гликолиза. При значениях pH, меньших 5,6, наклон кривой резко увеличивается, что обусловлено основным вкладом в процесс гибели клеток.

Как было показано в работе /5/, летальное действие на клетки глюкозной нагрузки в условиях гипоксии обусловлено гибелью клеток при низких значениях pH. Причем критической величиной pH, ниже которой происходит существенная гибель клеток рака Эрлиха, является значение pH=5,6. Сопоставление этого результата с полученными нами данными позволяет предположить, что тестируемая нами по критерию необратимой потери гликолитической активности гибель клеток коррелирует с потерей ими способности образовывать опухоль в организме /5/.

Таблица I. Гликолитическая активность клеток при снижении pH и после их отмывки от лактата

№ эксп.	В начале инкубирования		Перед отмывкой		После отмывки	
	pH	$\frac{\text{нмоль}}{10^8 \text{ кл.с}}$	pH	$G \frac{\text{нмоль}}{10^8 \text{ кл.с}}$	pH	$G \frac{\text{нмоль}}{10^8 \text{ кл.с}}$
1	7,30	5,9	6,42	2,5	7,28	6,6
2	7,24	6,8	6,19	1,7	7,01	6,3
3	7,24	7,4	5,82	1,1	7,07	7,5

В таблице I приведены результаты эксперимента, в котором нейтрализацию кислых значений pH производили не с помощью добавления в камеру щелочи, а путем отмывки клеток от лактата центрифугированием и ресуспендирования в свежем растворе. Затем суспензию снова помещали в камеру и исследовали накопление лактата. Закисление среды после отмывки клеток от лактата происходило медленнее, чем в исходной суспензии, однако это связано с потерей части клеток при центрифугировании. При нормировке же полученных результатов на концентрацию жизнеспособ-

ных клеток скорости накопления лактата в исходной суспензии и после отмывки от лактата, как это видно из таблицы I, не отличаются. Эти результаты подтверждают сделанный ранее вывод о том, что снижение скорости накопления лактата при уменьшении pH обусловлено по крайней мере двумя процессами: гибелью клеток и обратимым подавлением анаэробного гликолиза. Причем в клетках, которые идентифицируются нами как жизнеспособные, подавление анаэробного гликолиза при снижении pH вплоть до 5,8 полностью обратимо.

Учитывая вышеприведенные результаты, интенсивностью анаэробного гликолиза будем считать скорость накопления лактата на линейном участке кривой, обозначим эту величину G и будем выражать ее в нмоль

Таблица 2. Результаты исследования анаэробного гликолиза суспензионных культур клеток

Клетки	Серия	Концентрация НБРЕС, мм	Концентрация клеток, млн/мл	$G \frac{\text{нмоль}}{10^8 \text{ кл.с}}$	
Асцитный рак Эрлиха	1	4	17	9,2	
		4	17	9,2	
		4	17	8,3	
		19	23,5	9,3	
					$9,0 \pm 0,5$
	2	19	4,2	10,0	
		7,6	3,1	9,8	
		7,6	3,1	9,5	
				$10,1 \pm 0,8$	
L5178Y - S	3	4	6,7	5,1	
		4	6,7	5,6	
		4	6,7	5,2	

на 100 млн. клеток за секунду. Результаты, приведенные на рис. 2, указывают также на необходимость оптимального выбора буферной емкости (концентрации НЕРЕС) раствора, в котором исследуется гликолитическая активность. Эта буферная емкость должна определяться концентрацией клеток исследуемой суспензии и обеспечивать снижение pH, достаточное для достоверного определения гликолитической активности, но не приводящее к существенному отклонению кривой накопления лактата от линейности.

Точность определения гликолитической активности должна обеспечивать повторяемость результатов, получаемых на идентичном материале. Насколько предлагаемый нами подход удовлетворяет этому условию, можно судить на основании данных, приведенных в таблицах 2 и 3.

В таблице 2 приведены результаты исследования интенсивности анаэробного гликолиза клеток в трех сериях экспериментов. В каждой серии определяли гликолитическую активность клеток, взятых из одной суспензии, однако каждое измерение проводили в отдельной камере, причем варьировали концентрацию клеток и буферную емкость среды. В таблице 2 кроме результатов отдельных измерений приведены выборочные средние и выборочные дисперсии для каждой серии экспериментов. Как видим, точность измерений не ниже 6-8%, что вполне удовлетворительно для такого рода исследований. Приведенные дисперсии включают возможное влияние концентрации клеток и буферной емкости на результат измерений, но не учитывают ошибку в определении этих величин, поскольку их изменяли путем кратного разбавления, а также ошибку в оценке доли жизнеспособных клеток, так как эту оценку производили один раз для всей серии. Для учета этих, а также ряда других факто-

Таблица 3. Результаты исследования анаэробного гликолиза клеток солидной опухоли

Клетки	Концентрация клеток, млн/мл	$\frac{\text{нмоль}}{\text{г}} \cdot 10^8 \text{ кл. с}$
E1D	0,77	11,0
	1,4	10,4
Солидная форма	8,0	13,0
	1,6	10,0
	2,2	10,0
		Среднее: $10,9 \pm 1,3$

ров, которые могут неконтролируемо меняться от одной серии опытов к другой, мы провели следующий эксперимент. Измеряли интенсивность анаэробного гликолиза идентичного материала, но взятого от разных животных и в разные дни. Использовали клетки линии E1D, полученные из солидных опухолей. Тем самым учитывали также возможное влияние процесса получения клеточной суспензии на точность результата. Данные, полученные в этом эксперименте, приведены в таблице 3. Как видим, в этом случае выборочная дисперсия не превышает 12%, что также вполне удовлетворительно для такого рода исследований.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе результаты позволяют сделать следующие выводы. Использование методики измерения pH в суспензии гликолизующих клеток позволяет определить интенсивность анаэробного гликолиза как скорость накопления лактата на линейном участке кривой, нормированную на концентрацию клеток. Применение указанного метода обеспечивает ошибку измерения около 12%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что скорость накопления лактата в суспензии гликолизующих клеток уменьшается при снижении pH. Это явление обусловлено по крайней мере двумя причинами: обратимым подавлением анаэробного гликолиза и гибелью клеток при уменьшении pH. Гибель клеток, тестируемая в наших экспериментах как необратимое подавление анаэробного гликолиза, по всей видимости, коррелирует с потерей ими способности образовывать опухоль в организме.

Авторы благодарят Н.Л. Шамакову за предоставление суспензии клеток и образцов солидной опухоли E1D.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шапот В.С. Биохимические аспекты опухолевого роста. Медицина, М., 1975.
2. Ardenne von M. Selective Verstärkung einer premaren Krebszellen-schädigung als Fundamentalprozess der Krebs-Mehrschritt-Therapie. Turin Lecture, 1969.
3. Александров Н.Н., Савченко Н.Е., Фрадкин С.З., Жаврид Э.А. Применение гипертермии и гипергликемии при лечении злокачественных опухолей. Медицина, М., 1980.
4. Ярмоненко С.П., Шапот В.С., Осинский С.П. - Экспериментальная онкология, 1984 № 2, с.3-8.

5. Шамова Н.Л., Ярмоненко С.П., Лазер К. и др.-Экспериментальная онкология, 1987, №1, с.57 - 65.
6. Мещерикова В.В., Волошина Е.А.-Мед.радиология, 1983, №7, с.3 - 16.
7. Ярмоненко С.П., Шапот В.С., Волошина Е.А. и др.-Мед.радиология, №2, с.46 - 51.
8. Лобачевский П.Н., Оводков Ю.В. ОИЯИ, Р 19 - 89 - 307, Дубна, 1989.
9. Belt J.A., Thomas J.A., Buchsbaum R.N. et al. - Biochemistry, 1979, V.18, N.16 p.3506-3511.
10. Джиллиз Р.Дж. В кн.: Трансформированная клетка. Под ред. Камерона И.Л., Пула Т.Б. Наукова думка, Киев, 1985, с.317 - 359.

Рукопись поступила в издательский отдел  
23 июня 1989 года.