

© Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2011
УДК 616 – 006.04: 576.535

Вплив дефіциту поживних субстратів на виживаність пухлинних клітин з різною чутливістю до протипухлинної антиангіогенної терапії

О.М.Пясковська

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України
Київ, Україна

Ероботі було досліджено вплив метаболічного стресу, спричиненого дефіцитом поживних субстратів *in vitro*, на виживаність варіантів клітин карциноми легені Льюїс з низькою (LLC) та високою (LLC/R9) чутливістю до дії протипухлинної антиангіогенної терапії. Суттєвих відмінностей в чутливості клітин LLC та LLC/R9 до гострого дефіциту глюкози та глютаміну в умовах нормоксії виявлено не було, однак за механізмами формування адаптаційних реакцій до дефіциту поживних речовин були встановлені значні відмінності. Адаптація клітин LLC реалізується через їх високу здатність переходити із стану проліферації у стан спокою, тоді як виживаність клітин LLC/R9 може бути обумовлена, зокрема, ініціацією макроаутофагії.

Ключові слова: карцинома легені Льюїс, чутливість до протипухлинної антиангіогенної терапії, метаболічний стрес.

ВСТУП

Відомо, що протипухлинна антиангіогенна терапія (ПАТ) на сьогодні розглядається як одна з нових перспективних стратегій лікування онкологічних хворих [3, 6, 7]. Однак аналіз результатів впровадження ПАТ у клінічну практику показав, що її ефективність не завжди співвідноситься з надспішними результатами доклінічних досліджень [4, 5]. Це обумовлено тим, що протипухлинна дія ПАТ є не прямою, а опосередкованою. Її ефективність залежить не

тільки від ефективного інгібування пухлинного ангіогенезу (ефективна антиангіогенна дія), але й від високої чутливості пухлинних клітин до дефіциту поживних субстратів, який виникає внаслідок ефективного пригнічення неоваскуляризації (ефективна протипухлинна дія). Механізми адаптації пухлинних клітин до несприятливого мікрооточення на сьогодні є малодослідженими [2, 11].

Метою роботи було дослідити *in vitro* вплив метаболічного стресу, спричиненого дефіцитом поживних субстратів, на виживаність пухлинних клітин з різною чутливістю до протипухлинної антиангіогенної терапії.

У роботі було використано два варіанти карциноми легені Льюїс – LLC та LLC/R9. LLC/R9 порівняно з LLC характеризується високим ангіогенним та низьким метастатичним потенціалом [12, 15, 16]. Такі особливості росту та метастазування варіанта LLC/R9 корелюють з його високою, на відміну від LLC, чутливістю до ПАТ [8, 16].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Два варіанти клітин карциноми легені Льюїс було отримано з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штабів ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України. Клітини LLC та LLC/R9 підтримували *in vitro* у стандартному поживному середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (ЕТС) (Sigma, США) та 40 мкг/мл гентаміцину при 37°C у вологих умовах, 5% CO₂.

Для визначення впливу метаболічного стресу на виживаність пухлинних клітин обидва варіанти клітин висаджували в 6-см чашки Петрі (6*10⁵ клітин/чашку). По закінченні тер-

міну передінкубації (точка «0») середовище замінювали на свіже: стандартне (11 мМ глюкози, 2 мМ L-глутаміну), середовище без глюкози (0 глюкози, 2 мМ L-глутаміну, Sigma, США) або без глутаміну (11 мМ глюкози, 0 L-глутаміну Sigma, США) з додаванням 10% ЕТС. Надалі клітини інкубували протягом 5 діб без заміни середовища в умовах нормоксії.

Кількість клітин та їх життєздатність оцінювали за допомогою їх прямого підрахунку з використанням 0,4% розчину трипанового синього.

Оцінку рівня апоптозу в клітинах проводили з використанням Hoechst 33258 (Sigma, США). Для цього клітини забарвлювали Hoechst 33258 у кінцевій концентрації 1 мкг/мл при 37°C протягом 20 хв., промивали фізіологічним розчином та оцінювали зміни морфології ядер, підраховуючи не менше 500 клітин/зразок. Апоптотичні клітини визначали за наявністю фрагментованого ядра або конденсованого хроматину та виражали у відсотках від загальної кількості клітин.

Оцінку розподілу клітин за фазами клітинного циклу проводили за допомогою проточної цитофлуориметрії згідно з I.Nicoletti et al. [10].

Визначення рівня глюкози в середовищі інкубації проводили за допомогою ензиматичного глюкозооксидантного методу з використанням набору для визначення глюкози в біологічних рідинах (Sigma, США) згідно з протоколом виробника.

Статистичний обрахунок результатів дослідження проводили за допомогою описативних методів, нелінійного регресійного аналізу, t критерію Стьюдента з використанням програм Microsoft Excel і Microcal Origin.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що за умов 5-денної інкубації в стандартному середовищі, тобто за умов поступового наростання дефіциту поживних речовин, кінетика росту обох варіантів клітин носила немонотонний характер (рис. 1). Протягом перших 2-х діб спостерігали їх експоненційний ріст, а при досягненні максимальної кількості відбувалося уповільнення їх росту та поступове відмирання на тлі поступового наростання дефіциту поживних речовин. Вища швидкість росту клітин LLC/R9 в експоненційній фазі порівняно з відповідною клітин LLC, очевидно, пояснювалася меншою в 1,4 рази ($p < 0,05$) часткою клітин у фазі G0/G1 в точці «0» (рис. 2),

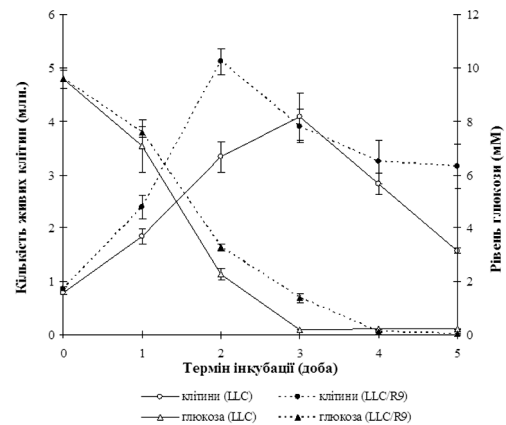


Рис. 1. Кінетика росту клітин LLC та LLC/R9 та зміни рівня глюкози в стандартному середовищі інкубації з різним вмістом глюкози та глутаміну.

що, згідно з G.I.Solyanik et al. [14], призводить до уповільнення швидкості росту пухлинних клітин. Внаслідок такого уповільнення кількість живих клітин у випадку LLC, на відміну від LLC/R9, досягала свого максимуму із запізненням, лише на 3-ю добу, однак дана величина суттєво не відрізнялася від відповідної у випадку LLC/R9 (рис. 1).

Поступове наростання дефіциту поживних речовин у стандартному середовищі і, зокрема, зниження рівня глюкози з 11 мМ до практично нульових значень призводило в обох випадках до загибелі частини клітин та їх перерозподілу за фазами клітинного циклу. Зниження рівня глюкози в середовищі інкубації обумовлювало накопичення обох варіантів клітин у фазі G0/G1, значно вираженіше у випадку LLC/R9 (рис. 2).

Так, у випадку LLC максимальну кількість ($46,2 \pm 1,0\%$) клітин у фазі G0/G1, яка в 1,5 рази ($p < 0,05$) перевищувала відповідну в точці «0», було зафіксовано лише на 5-у добу, коли рівень глюкози падав до наднизьких значень ($0,2 \pm 0,01$ мМ). Натомість у випадку LLC/R9 максимальну кількість ($60,1 \pm 0,6\%$) клітин у фазі G0/G1, яка майже втричі ($p < 0,05$) перевищувала відповідну в нульовій точці, було зафіксовано вже на 3-ю добу, коли рівень глюкози дорівнював $1,4 \pm 0,2$ мМ. Прогресивне зростання кількості клітин LLC/R9 у фазі G0/G1 на фоні поступового виснаження середовища на глюкозу вказує на значно вищу чутливість клітини LLC/R9 до дефіциту глюкози порівняно з клітинами LLC.

Виснаження середовища інкубації поживними речовинами в процесі росту клітин LLC та LLC/R9 обумовлювало їх загибель як за рахунок некрозу, так і апоптозу (табл. 1, 2). Слід зазначити, що активізація процесів відмирання

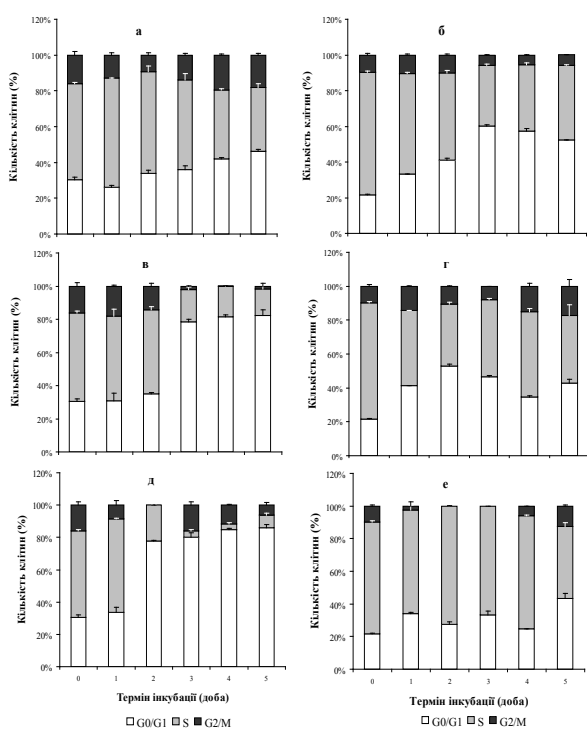


Рис. 2. Перерозподіл клітин LLC (а, в, д) та LLC/R9 (б, г, е) за фазами клітинного циклу за умов їхньої інкубації в стандартному (а, б) і дефіцитному за вмістом глюкози (в, г) та глютаміну (д, е) середовищі.

ня клітин LLC спостерігалася одразу ж після падіння вмісту глюкози до нуля, у той час як у випадку LLC/R9 процеси клітинної загибелі активувалися ще за наявності глюкози на рівні $3,2 \pm 0,1$ мМ. Останнє підтверджувало вищу чутливість LLC/R9 до дефіциту глюкози порівняно з LLC. Тим не менше суттєвих відмінностей між рівнем загибелі (як шляхом некрозу, так і шляхом апоптозу) обох варіантів клітин виявлено не було.

Не дивлячись на високу чутливість клітин LLC/R9 до дефіциту глюкози, кількість живих клітин на 5-у добу майже вдвічі ($p < 0,05$) перевищувала відповідну у випадку LLC (рис. 1).

Це вказувало на вищу здатність клітин LLC/R9 порівняно з клітинами LLC адаптуватися до метаболічного стресу за нормоксичних умов. Одним з механізмів такої адаптації є макроаутофагія [9, 13]. Згідно з дослідженням Д.Л. Колесника [1], кількість аутофаголізосом у клітинах LLC/R9 на пізніх термінах їх довготривалої інкубації без заміни середовища дійсно значно перевищує цей показник у клітинах LLC.

Дослідженням кінетики росту клітин LLC та LLC/R9 в середовищі, дефіцитному за вмістом глюкози, було виявлено, що обидва варіанти проявляли однаково високу чутливість до різкого дефіциту глюкози в перші дві доби (рис. 3).

У порівнянні зі стандартним середовищем кількість живих клітин як LLC, так і LLC/R9 прогресивно зменшувалась як за рахунок збільшення їх кількості у фазі G0/G1 (особливо для клітин LLC/R9, рис. 2), так і за рахунок значного підвищення рівня апоптозу (особливо у випадку клітин LLC, табл. 2). Після 2-ї доби спостерігалась стабілізація рівня живих клітин LLC/R9, кількість яких дуже повільно зменшувалась протягом наступних трьох діб. У той же час кількість живих клітин LLC продовжувала прогресивно зменшуватись на фоні різкого накопичення цих клітин у фазі G0/G1 та зниження їх кількості в S-фазі. Так, на 3-5-у добу кількість клітин LLC у фазі G0/G1 зростала до 79-82%, що майже втричі ($p < 0,05$) перевищувало відповідний показник у нульовій точці (рис. 2). Кількість клітин LLC в S-фазі на 5-у добу падала більш ніж втричі ($p < 0,05$) порівняно з нульовою точкою. На противагу суттєвого перерозподілу клітин LLC/R9 за фазами клітинного циклу виявлено не було.

Найбільші відмінності в кінетиці росту досліджуваних варіантів клітин було виявлено в разі їх інкубації в середовищі, дефіцитному за вмістом глютаміну. Так, на відміну від LLC, вже на 1-у добу інкубації клітин LLC/R9 за умов різкого дефіциту глютаміну було зафіксовано зни-

ТАБЛИЦЯ 1

Вплив дефіциту поживних речовин на рівень загибелі пухлинних клітин

Термін інкубації (доба)	Кількість мертвих клітин (%)					
	LLC			LLC/R9		
	стандарт	дефіцит глюкози	дефіцит глютаміну	стандарт	дефіцит глюкози	дефіцит глютаміну
	1	2	3	4	5	6
1	10,2±4,0	8,4±2,1	8,3±1,2	8,4±1,3	5,3±1,8	8,5±0,7
3	16,3±0,6	26,2±3,1	13,5±1,7*	18,1±6,9	16,9±7,0	10,6±0,7
5	31,5±4,4	61,3±1,3*	17,7±3,4*	13,0±5,5	48,5±4,6*	30,2±0,5 ^{x±}

Примітка: *, x, ± – $p < 0,05$ (* – 2 та 6 статистично достовірно відрізняються від 1 та 4 відповідно; x – 2 та 5 – від 3 та 6 відповідно; ± – 3 від 6).

ТАБЛИЦЯ 2

Вплив дефіциту поживних речовин на рівень апоптозу пухлинних клітин

Термін інкубації (доба)	Кількість апоптотичних клітин (%)					
	LLC			LLC/R9		
	стандарт	дефіцит глюкози	дефіцит глютаміну	стандарт	дефіцит глюкози	дефіцит глютаміну
	1	2	3	4	5	6
1	2,7±1,1	6,4±2,4	5,5±2,0	2,6±1,1	4,3±2,3	3,8±0,04
3	14,2±2,0	14,3±1,8	10,3±1,5	10,8±1,0 ¹	7,3±0,4	16,5±3,3
5	7,2±1,0	6,4±0,9	12,7±0,3* ^x	12,4±3,2	12,6±1,6 [±]	22,5±1,8* [±]

Примітка: *, ^x, ¹, [±] – $p < 0,05$ (* – 2 та 5 статистично достовірно відрізняється від 3 та 6 відповідно; ^x – 3 від 1; ¹ – 5 від 4; [±] – 2 та 3 від 5 та 6 відповідно).

ження кількості живих клітин на 36% ($p < 0,05$) порівняно з відповідною В разі їх інкубації в стандартному середовищі (рис. 4,а). Цікаво, що таке інгібування проліферації клітин LLC/R9 внаслідок дефіциту глютаміну відбувалося на фоні високого рівня глюкози, який суттєво не відрізнявся від аналогічного показника в стандартному середовищі (рис. 4,б). Крім того, у випадку LLC/R9 дефіцит глютаміну призводив до монотонного зростання рівня апоптозу (табл. 2). На 5-у добу було зафіксовано максимальний рівень апоптотичних клітин, який майже вдвічі ($p < 0,05$) перевищував відповідний у разі їх інкубації в стандартному середовищі.

Подальше зниження кількості живих клітин LLC/R9 не супроводжувалося суттєвим зростанням рівня їх загибелі, що свідчило про їхню здатність вижити за цих умов, але вказувало на їхню неспроможність підтримувати проліферацію. Останнє стосувалося і клітин LLC, однак, на відміну від LLC/R9, така «стабілізація» кількості живих клітин, очевидно, була пов'язана з їх високою акумуляцією у фазі G0/G1.

Дефіцит глютаміну, як і дефіцит глюкози, призводив до різкого зростання кількості клітин LLC у фазі G0/G1, починаючи вже з 3-

ї доби. Така висока кількість (80,3±2,4%, рис. 2) клітин LLC у фазі G0/G1, яка майже вдвічі ($p < 0,05$) перевищувала їх максимальний рівень у стандартному середовищі, очевидно, не була пов'язана тільки зі зниженням рівня глюкози в середовищі інкубації. Про це свідчив той факт, що рівень глюкози на 3-5-у добу інкубації в середовищі, дефіцитному на вміст глютаміну, на порядок перевищував відповідний у стандартному середовищі та залишався в межах 2,6-1,8 мМ.

Суттєво, що у випадку LLC/R9, на відміну від LLC, при їх інкубації за умов дефіциту глютаміну такого вираженого накопичення клітин у фазі G0/G1 виявлено не було, що, ймовірно, було пов'язано в тому числі з тим, що рівень глюкози в середовищі інкубації навіть на 5-у добу зберігався в межах 4 мМ (рис. 4б).

ВИСНОВКИ

Таким чином, проведені дослідження показали, що клітини LLC та LLC/R9 за умов нормоксії суттєво не відрізняються чутливістю до гострого дефіциту глюкози та глютаміну в середовищі інкубації в перші дні росту, але про-

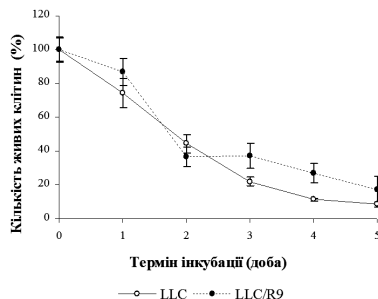


Рис. 3. Кінетика росту клітин LLC та LLC/R9 в середовищі, дефіцитному за вмістом глюкози (кількість живих клітин на момент оцінки наведена у відсотках від відповідного показника клітин, що інкубувались у стандартному середовищі).

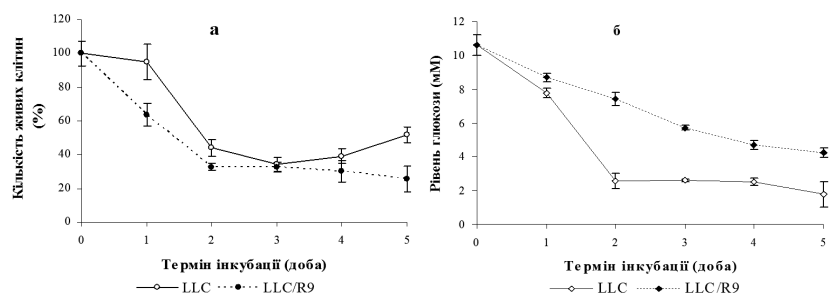


Рис. 4. Кінетика росту клітин LLC та LLC/R9 (а) та зміни рівня глюкози (б) в середовищі, дефіцитному за вмістом глютаміну (кількість живих клітин наведена як на рис. 3).

являють значні відмінності в механізмах формування адаптації до такого метаболічного стресу. Для клітин LLC є характерним значне блокування проліферативної активності за рахунок переходу у фазу G0/G1. На відміну від LLC, клітини LLC/R9 характеризуються низькою здатністю до перемикання в стан спокою, а їх адаптація до метаболічного стресу, очевидно, обумовлена ініціацією макроаутофагії, що дозволяє зберегти достатньо високу проліферативну активність цих клітин.

Відомо, що ріст злоякісних пухлин, так само як і ефективна протипухлинна антиангіогенна терапія, обумовлює виникнення в пухлині гіпоксії, якій передують формування дефіциту енергетичних та пластичних субстратів. Оскільки макроаутофагія є енергозалежним процесом, можна припустити, що дефіцит кисню буде призводити до значної загибелі пухлинних клітин LLC/R9. У той же час здатність клітин LLC у відповідь на дефіцит субстратів накопичуватись у фазі G0/G1, яка є малочутливою до гіпоксії, ймовірно, може бути однією з головних причин низької чутливості цих клітин до протипухлинної антиангіогенної терапії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Колесник Д.Л. Біологічні властивості модифікованого варіанту карциноми легені Льюїс, асоційовані з пухлинним ангиогенезом: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2010. — 20 с.
2. Aykin-Burns N., Ahmad I.M., Zhu Y. et al. Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation // *Biochem. J.* — 2009. — Vol. 418. — P. 29-37.
3. Benouchan M., Colombo B.M. Anti-angiogenic strategies for cancer therapy // *Int. J. Oncol.* — 2005. — Vol. 27 — P. 563-571.
4. Bergers G., Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy // *Nat Rev Cancer.* — 2008. — Vol. 8. — P. 592-603.
5. Ebos J.M., Lee C.R., Kerbel R.S. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy // *Clin. Cancer Res.* — 2009. — Vol. 15 — P. 5020-5025.
6. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications // *N. Engl. J. Med.* — 1971. — Vol. 285. — P. 1182-1186.
7. Kerbel R.S. A cancer therapy resistant to resistance // *Nature.* — 1997. — Vol. 390. — P. 335-336.
8. Kolesnik D.L., Pyaskovskaya O.N., Dasyukevich O.I. et al. Significant antimetastatic efficacy of metronomic low-dose oral cyclophosphamide against highly angiogenic variant of Lewis lung carcinoma / International conference «Tumor and host: Novel aspects of old problem», Kiev, 2010 // *Exp. Oncol.* — 2010. — Vol. 32 (Suppl.). — P. 94.
9. Levine B., Klionsky D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy // *Dev. Cell.* — 2004. — Vol. 6. — P. 463-477.
10. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // *J. Immunol. Methods.* — 1991. — Vol. 139. — P. 271-280.
11. Park H.R., Tomida A., Sato S. et al. Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2004. — Vol. 96. — P. 1300-1310.
12. Pyaskovskaya O.N., Dasyukevich O.I., Kolesnik D.L. et al. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance // *Exp. Oncol.* — 2007. — Vol. 29. — P. 197-202.
13. Sato K., Tsuchihara K., Fujii S. et al. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67. — P. 9677-9684.
14. Solyanik G.I., Berezetskaya N.M., Bulkewicz R.I. et al. Different growth patterns of cancer cell population as a function of its starting growth characteristics: analysis by mathematical model // *Cell Prolif.* — 1995. — Vol. 28. — P. 263-278.
15. Solyanik G.I., Pyaskovskaya O.N., Garmanchouk L.V. Cisplatin-resistant Lewis lung carcinoma cells possess increased level of VEGF secretion // *Exp. Oncol.* — 2003. — Vol. 24. — P. 260-265.
16. Solyanik G.I., Fedorchuk A.G., Pyaskovskaya O.N. et al. Anticancer activity of aconitine-containing herbal extract BC1 // *Exp. Oncol.* — 2004. — Vol. 26. — P. 307-311.

О.Н.Пясковская. Влияние дефицита питательных веществ на выживаемость опухолевых клеток с разной чувствительностью к действию противоопухолевой антиангиогенной терапии. Киев, Украина.

Ключевые слова: карцинома легкого Льюис, чувствительность к действию противоопухолевой антиангиогенной терапии, метаболический стресс.

В работе было изучено влияние метаболического стресса, вызываемого дефицитом питательных веществ *in vitro*, на выживаемость вариантов клеток карциномы легкого Льюис с низкой (LLC) и высокой (LLC/R9) чувствительностью к действию противоопухолевой антиангиогенной терапии. Существенных различий в чувствительности клеток LLC и LLC/R9 к острому дефициту глюкозы и глутамина в условиях нормоксии выявлено не было, однако по механизмам формирования адаптационных реакций к дефициту питательных веществ были обнаружены значительные отличия. Адаптация клеток LLC реализуется за счет их высокой способности переходить из состояния пролиферации в состояние покоя, в то время как выживаемость клеток LLC/R9 может быть обусловлена в том числе инициацией макроаутофагии.

O.N.Piaskovskaia. Influence of nutrient deficit upon viability of tumor cells with different sensitivity to antitumor antiangiogenic therapy. Kyiv, Ukraine.

Key words: Lewis lung carcinoma, sensitivity to antitumor antiangiogenic therapy, metabolic stress.

The influence of metabolic stress resulted from nutrient deficit upon survival of Lewis lung carcinoma (LLC) cells with low sensitivity to anticancer antiangiogenic therapy and its variant LLC/R9 with high sensitivity to anticancer antiangiogenic therapy

was investigated in vitro. It was shown that in aerobic conditions the sensitivity of LLC to acute glucose and glutamine deficit didn't differ significantly from that of LLC/R9 cells. Despite this LLC and LLC/R9 cells showed considerably different mechanisms of adaptation to such metabolic stress. Adaptation of LLC cells was realized through transition from proliferation to G0 rest state while the survival of LLC/R9 cells under metabolic stress may be resulted from initiation of macroautophagy.

Надійшла до редакції 22.09.2011 р.