

УДК 612.57: 616.06

## ЭФФЕКТ ГИПЕРТЕРМИИ НА КЛЕТКИ АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ 22А

Т.И. Терпинская, К.Б.Н.

Институт физиологии НАН Беларуси

После 2-часовой гипертермии *in vitro* при 42°C выживает 79%, при 43°C – 74%, при 44°C – 43%, при 45°C – 34%, при 46°C – 24% клеток асцитной гепатомы 22а. Период наиболее выраженной гибели клеток регистрируется в первые 10 мин, затем следует фаза плато, после чего вновь происходит ускорение клеточной гибели, при 42 и 43°C незначительное, завершающееся длительной фазой плато, при 44 – 46°C – более выраженное, замедляющееся на 90-й – 100-й мин прогрева. При последующей инкубации при 17°C в течение 3-х часов жизнеспособность клеток, предварительно прогретых при 42, 43, 44, 45 и 46 °C, снижается на 14, 22, 52, 43, 30%, соответственно.

**Ключевые слова:** гипертермия, опухоль.

79% of hepatoma 22a cells survive at 42°C, 74% – at 43°C, 43% – at 44°C, 34% – at 45°C, 24% – at 46°C under 2 h *in vitro* hyperthermia. Significant cell death is registered in the first 10 min of the heating, followed by plateau, and then cell death intensification takes place, it being minor at 42 and 43°C, followed by prolonged plateau, and well-marked at 44 – 46 °C with decreasing in 90 – 100 min of the heating. 3 h incubation at 17°C after 42, 43, 44, 45 u 46 °C hyperthermia results in 14, 22, 52, 43, 30% cell viability reduction, respectively.

**Key words:** hyperthermia, tumor.

Повышение температуры тела в процессе ответа на инфекционные заболевания или вызванное искусственно может приводить к торможению роста опухоли и снижению опухолеобразования, что является основой для использования гипертермии как одного из методов лечения рака. Однако высокие температуры действуют губительно не только на опухолевые, но, хотя в меньшей степени, и на нормальные клетки организма. Поэтому для разработки оптимальных режимов терапии требуется точное знание кинетики гибели клеток как при близких к физиологическим температурах, нагрев до которых ведется при общей гипертермии, так и при значительно более высоких, применяющихся при локальном прогреве опухоли. В представленной работе прослежена динамика гибели клеток асцитной гепатомы 22а при гипертермии в интервале температур от 42 до 46 °C в опытах *in vitro*.

### Материалы и методы

Получали у мышей линии Af асцит гепатомы 22а на 12 – 17 дни роста опухоли после ее внутрибрюшинной прививки в дозе 6 млн клеток на мышшь. Разводили полученный асцит в 200 раз раствором Эрла и разливали в 14 отдельных пенициллиновых флаконов по 1,5 мл суспензии в каждом. Один флакон оставляли на 2 ч при 37°C, второй – при комнатной температуре – 17 °C, остальные помещали в водный термостат при температуре от 42 до 46°C в разных сериях опыта. До начала и гипертермии и через каждые 10 мин прогрева из термостата брали флакон с пробой и проводили анализ жизнеспособности клеток, используя трипановый синий; этот флакон в эксперименте больше не использовали. Подсчитывали по 6 – 10 проб, у одного животного брали по 2 пробы. После окончания прогрева продолжали анализ гибели клеток в исследуемых суспензиях в течение 3-х часов, анализируя от 4 до 8 проб.

дующих суспензиях в течение 3-х часов, анализируя от 4 до 8 проб.

### Результаты и обсуждение

При гипертермическом воздействии доля жизнеспособных клеток в суспензии постепенно снижалась, причем, анализ динамики процесса показал, что существуют периоды быстрой гибели клеток, и периоды, когда уменьшение доли живых клеток происходит очень медленно – фазы плато. Так, 10-минутный прогрев при 42°C привел к снижению количества живых клеток в суспензии на 4% ( $p > 0,05$ ), в течение последующих 30 мин (фаза плато) погибло ещё около 4% клеток ( $p < 0,05$ ), затем до 50-й мин наблюдали ускорение клеточной гибели и в суспензии регистрировалась 85%-я выживаемость ( $p < 0,05$ ). При 43°-м прогреве аналогичное количество выживших клеток наблюдалось на 40-й минуте гипертермии, причем, наиболее интенсивная гибель регистрировалась в первые 20 мин (гибло 10% клеточной популяции,  $p < 0,05$ ). Дальнейший прогрев при 42°C и 43°C приводил к постепенному снижению количества жизнеспособных клеток до 79 и 74%, соответственно, везде  $p < 0,05$ , рисунок 1. При 44°C через 30 мин регистрировали 85%-ю, а через 40 мин – 77%-ю выживаемость клеток. Затем до 70-й мин наблюдалась фаза плато, когда гибель клеток была незначительной, а с 70-й до 100-й мин – период быстрой гибели, к исходу которого 55% клеточной популяции погибло. Затем клеточная гибель замедлялась, и к 120-й мин регистрировалось 43 % живых клеток (во всех случаях  $p < 0,05$ ). Наиболее значительные отличия в сторону снижения выживаемости клеток при данном температурном режиме по сравнению с более мягкой гипертермией, наблюдались после 80 мин прогрева. Кривая выживаемости клеток при 45°-м

режиме была близка к таковой при 44°C, однако к 30-й мин эксперимента выживало меньше клеток (80%), фаза плато длилась до 60-й мин, когда количество живых клеток составляло 69%, в течение последующих 30 мин снижаясь до 39%, а к 120-й мин – до 34%. При 46°-м прогреве в течение 60 мин происходила быстрая гибель клеток, и к концу этого периода выживало менее 50% популяции; до 70-й минуты увеличения количества погибших клеток не наблюдали, затем регистрировалась постепенная гибель клеток и через 2 часа гипертермии выживало 24% клеток гепатомы 22а, во всех случаях  $p < 0,05$ , рисунок 1.

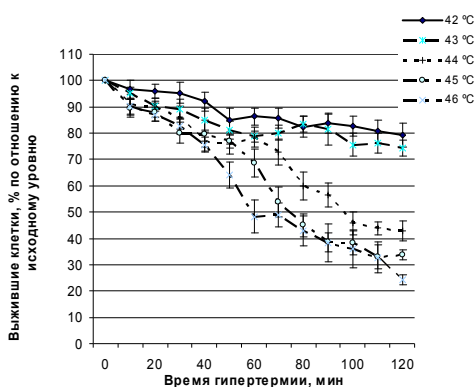


Рисунок 1 – Выживаемость клеток ГЕП 22а при различных режимах гипертермии

Сравнение полученных данных с результатами аналогичных экспериментов с асцитной карциномой Эрлиха [1] показывает, что клетки гепатомы 22а несколько более устойчивы к гипертермическому воздействию. Так, при 42°-м прогреве в суспензии гепатомы выживает на 5% больше клеток ( $p > 0,05$ ), при 43°-м – на 15% ( $p < 0,05$ ), при 45°-м – на 9,8% ( $p > 0,05$ ), при 46°-м – на 15% ( $p < 0,05$ ), при 44°-м режиме отличий не обнаружено.

Изучение выживаемости прогретых клеток при 180-минутной инкубации их при комнатной температуре показало, что в прогретой при 42°C суспензии концентрация выживших клеток имела тенденцию к снижению (уменьшение на 14%), однако достоверных отличий, по сравнению с выживаемостью сразу после прогрева, не получено. При дальнейшей инкубации при 17°C клеток гепатомы, предварительно прогретых 2 часа при 43°C, количество выживших клеток через 180 мин составляло 22% от уровня живых клеток непосредственно после гипертермии ( $p < 0,05$ ). В течение 3-х часов инкубации при комнатной температуре жизнеспособность клеток, предварительно прогретых при 44, 45 и 46°C, снижалась на 52 ( $p < 0,05$ ), 43 ( $p < 0,05$ ) и 30 % ( $p > 0,05$ ), соответственно, рисунок 2. При этом без предварительной гипертермии инкубация клеток в течение 2-х часов при комнатной температуре (17°C) приводила к снижению их жизнеспособности на 4,1%, в течение 5-ти часов – на 7%; при 37°C в течение 2-х часов – на 6,4%, при

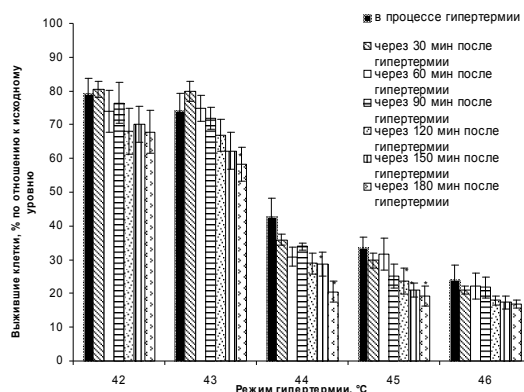


Рисунок 2 – Выживаемость клеток АКЭ в процессе и в течение 180 мин после окончания гипертермии;

\* –  $p < 0,05$  при сравнении с долей клеток, выживших в процессе 2-часовой гипертермии

37°C в течение 2-х часов и при комнатной температуре в течение последующих трех часов – на 9,1% (езде  $P < 0,01$ ).

Таким образом, цитотоксическое действие гипертермии зависит от длительности и температуры прогрева и выявляется не только в процессе гипертермии, но после ее окончания. Данные о том, что энергия, требующаяся для индукции клеточной смерти в начале экспоненциальной фазы гибели, коррелирует с энергией, при которой наблюдается потеря белковыми веществами их естественных свойств вследствие нарушения динамики и структуры молекул клеточных белков, привели к гипотезе, связывающей цитотоксический эффект гипертермии главным образом с денатурацией цитоплазматических и мембранных белков [5]. Наблюдаемая кинетика выживаемости клеток может быть обусловлена их различной термочувствительностью, зависящей, в частности, от фазы клеточного цикла. Так, наиболее термочувствительны клетки, находящиеся в S- и M-фазах клеточного цикла, а наиболее резистентны – находящиеся в G1-фазе [5]. Гипертермия индуцирует различные изменения организации цитоскелета и митотического аппарата клетки, что ведет к повреждению и гибели клеток в M-фазе [3]. Термочувствительность клеток в S-фазе обусловлена тем, что высокая температура, даже не вызывая значительных повреждений ДНК, препятствует ДНК-синтезу и репарации [5]. Может иметь значение также генетическая гетерогенность клеток по признаку устойчивости к тепловому шоку. Гипертермия вызывает как некроз, так и апоптоз, причем, на модели рака простаты показано, что при 42-43 °C индуцируется программируемая, а при более высокой температуре (44 °C) – некротическая гибель клеток [8]. На линии HL-60 показано, что при 45-градусной гипертермии в течение 5-60 мин сначала в апоптоз вступают клетки, находящиеся в S-фазе, а при продолжительном прогреве апоптоз развивается на всех фазах клеточного цикла [7]. Клеточная гибель при нагревании рассматривается как двухступен-

чатый процесс. Первый шаг – это индукция нелетальных повреждений, которые затем переходят в летальные (второй шаг) при дальнейшем нагревании. Интенсивность возникновения повреждений обоих типов зависит от температуры [6]. Это может быть одной из причин появления фазы плато в кривых выживаемости. При умеренной гипертермии наблюдается активация синтеза и функциональной активности белков теплового шока. Показано, что их аккумуляция в клетках в стационарной фазе роста может быть эндогенным механизмом защиты их от апоптотической смерти [2]. Показано, что поступление белков теплового шока в ядро зависит от белка p53, поэтому различная чувствительность клеточных линий к гипертермии может определяться p53-статусом [4]. Сокращение фазы плато и значительное ускорение гибели клеток при режимах прогрева 44°C и выше в наших экспериментах может быть свидетельством в пользу предположения, что при таких температурах нарушается протекторная функция белков теплового шока. Это также согласуется с фактом, что энергия, необходимая для индуцирования клеточной гибели при высокотемпературном прогреве (44°C и более), значительно ниже, чем таковая при более мягкой гипертермии [5].

#### Выводы

После 2-часовой гипертермии *in vitro* при 42°C выживает 79%, при 43°C – 74%, при 44°C – 43%, при 45°C – 34%, при 46°C – 24% клеток асцитной гепатомы 22а. Период наиболее выраженной гибели клеток регистрируется в первые 10 мин прогрева, затем следует фаза плато, после чего вновь происходит ускорение клеточной гибели, при 42 и 43°C

незначительное, завершающееся длительной фазой плато, при 44 – 46°C – более выраженное, замедляющееся на 90-й – 100-й мин прогрева. При последующей инкубации при 17°C в течение 3-х часов жизнеспособность клеток, предварительно прогретых при 42, 43, 44, 45 и 46 °C, снижается на 14, 22, 52, 43, 30%, соответственно.

#### Литература

1. Терпинская Т.И., Кашевский Б.Э., Кульчицкий В.А. Эффективность гипертермического воздействия на клетки асцитной карциномы Эрлиха *in vitro*. // Новости медико-биологических наук. – 2008. – № 1-2. – С. 83-87.
2. Gabai V.L., Zamulaeva I.V., Mosin A.F., Makarova Y.M., Mosina V.A., Budagova K. R., Malutina Y. V., Kabakov A. E. Resistance of Ehrlich tumor cells to apoptosis can be due to accumulation of heat shock proteins // FEBS Letters. – 1995. – Vol. 375, № 1-2. – P. 21-26.
3. Grzanka D., Stepień A., Grzanka A., Gackowska L., Helmin-Basa A., Szczepanski M.A. Hyperthermia-induced reorganization of microtubules and microfilaments and cell killing in CHO AA8 cell line // Neoplasma. – 2008. – Vol. 55, № 5. – P. 409-415.
4. Hamamoto T., Suzuki K., Yamauchi M., Kodama S., Sasaki H., Watanabe M. p53 status-dependent sensitization of human tumour cells to hyperthermia by plant flavonol // Int. J. Hyperthermia. – 2008. – Vol. 24, № 5. – P. 415-424.
5. Hildebrandt B., Wust P., Ahlers O., Dieing A., Sreenivasa G., Kerner T., Felix R., Riess H. The cellular and molecular basis of hyperthermia // Critical. Reviews in Oncology/Hematology. – 2002. – Vol. 43. – P. 33-56.
6. Jung H.A. Generalized concept for cell killing by heat. Effect of acutely induced thermotolerance and decay of thermosensitization // Radiat. Res. – 1994. – Vol. 139, № 3. – P. 280-289.
7. Lim C.U., Zhang Y., Fox M.H. Cell cycle dependent apoptosis and cell cycle blocks induced by hyperthermia in HL-60 cells // Int. J. Hyperthermia. – 2006. – Vol. 22, № 1. – P. 77-91.
8. Moriyama-Gonda N., Igawa M., Shiina H., Urakami S., Shigeno K., Terashima M. Modulation of heat-induced cell death in PC-3 prostate cancer cells by the antioxidant inhibitor diethyldithiocarbamate // BJU Int. – 2002. – Vol. 90, № 3. – P. 317-325.

Поступила 09.04.09