

УДК 616—006—008.9:577.151.5+577.151.5.05

ИЗМЕНЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

А. В. НЕРКАРАЯН, Г. А. ПАНОСЯН

При развитии асцитной карциномы Эрлиха наблюдаются изменения изоферментного состава лактатдегидрогеназы в головном мозге, сердечной мышце, наиболее резкие—в печени мыши.

Увеличение содержания Н-субъединиц, общей активности лактатдегидрогеназы и изменение отношения М:Н в печени отмечаются уже через 1 час после введения опухолевых клеток и достигают максимума через 6—12 час.

Величина и скорость проявления изменений зависят от количества вводимых клеток асцитной карциномы и скорости роста опухоли.

Введение разрушенных опухолевых клеток и гомогената печени не приводит к подобным изменениям.

Исследование изоферментного состава лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в клетках высших организмов при различных функциональных и патологических состояниях представляет значительный интерес. Последний обусловлен, с одной стороны, особенностями структуры фермента (состоящего из четырех субъединиц одного или двух типов) и, с другой—чувствительностью изоферментного состава к различного рода воздействиям, его зависимостью от дифференциации тканей, функционального состояния и других обстоятельств.

Известно, что изоферментный спектр лактатдегидрогеназы меняется при различных патологических состояниях, в частности, при гепатитах, острых интоксикациях, инфекциях, туберкулезе легких, ревматоидном артрите и др. [8, 10, 15, 17, 19] наблюдается смещение изоферментного спектра в сторону преобладания М-форм, т. е. изменения, характерного для сыворотки крови опухоленосителей или самой опухоли [3—5, 13, 18, 22].

Многочисленные исследования ЛДГ-спектров сыворотки крови больных со злокачественными опухолями обнаружили зависимость отклонений от степени злокачественности и стадий заболеваний, что было использовано при дифференциальной диагностике опухолевого роста [7, 11, 20, 21].

Однако, как было указано выше, сходные изменения наблюдаются в сыворотке крови также при неопухолевых заболеваниях, что не позволяет использовать этот тест (увеличение активности лактатдегидрогеназы с преобладанием М-форм в сыворотке крови) для дифференци-

альной диагностики злокачественного роста. Поэтому оправданы те исследования, в которых авторы пытались обнаружить какие-либо изменения в изоферментном составе лактатдегидрогеназы в непораженных опухолю тканях животных, несущих опухоль. Такой подход является чрезвычайно важным с точки зрения ранней диагностики злокачественного роста.

Имеющиеся по этому вопросу литературные данные разноречивы [1, 2, 6, 16] и не позволяют прийти к однозначным выводам о характерных изменениях в тканях животных, несущих ту или иную опухоль. Поэтому перед нами была поставлена задача дальнейшего и более детального исследования этого вопроса.

Материал и методика. Опыты проводили на белых беспородных мышах весом 25—30 г. Тканевые экстракты, обладающие ЛДГ-активностью, получали гомогенизацией ткани в 0,25 М сахарозе в течение 3—5 мин.

Гомогенат центрифугировали при 32000 г в течение 30 мин. Использовали надосадочную жидкость.

Изоферменты разделяли методом диск-электрофореза на полиакриламидном геле [14]. Активность изоферментов определяли денситометрированием и в элюатах. Элюировали с полиакриламидного геля 0.1 М калий-фосфатным буфером, рН 7.4.

Каждый образец белка наносили на два геля по 250 γ. После электрофореза один из пары гелей инкубировали в течение 1 часа в инкубационной смеси при 37°. Соответственно выявленным после инкубации полосам вырезали диски из неокрашенного геля, которые гомогенизировали в соответствующем буфере. Элюирование проводили в течение 12 час. Полученный элюат центрифугировали при 3000 г в течение 5 мин.

Активность ЛДГ в тканевых экстрактах и элюатах определяли спектрофотометрически на СФ-4А в термостатированной ячейке при 25° по изменению оптической плотности исследуемого раствора при 340 нм.

Активность выражали в мкмольх окисленного НАД·Н за единицу времени на мг белка по формуле

$$A = \frac{\Delta D}{2,07 \cdot B \cdot t}$$

где А—активность ЛДГ, ΔD—изменение оптической плотности, 2,07—коэффициент экстинкции НАД·Н при 340 нм, В—содержание белка, t—время измерения.

На денситограммах активность изоферментов рассчитывали по формуле

$$A = \frac{a}{2} \lg H,$$

где А—активность изофермента, $\frac{a}{2}$ —полуширина пика, H—высота пика.

Количество белка определяли по методу Лоурри.

Процентное содержание M (H)—субъединиц рассчитывали по формуле

$$M = \frac{1}{4} (4M_4 + 3M_3H_1 + 2M_2H_2 + M_1H_3) \%,$$

где M₄, M₃H₁, M₂H₂, M₁H₃—процентное содержание изоферментов ЛДГ.

Изменение активности генов, направляющих синтез субъединиц ЛДГ, рассчитывали по формулам

$$X = \frac{a_1}{a_0} \quad \text{и} \quad Y = \frac{A - a_1}{b_0}.$$

где X—изменение активности В гена. Y—изменение активности А гена, a_1 —процентное содержание Н-субъединиц в опытной последовательности, a_0 —процентное содержание Н-субъединиц в контроле, b_0 —процентное содержание М-субъединиц в контроле, А—общая активность ЛДГ (в % относительно контроля).

Отношение активностей генов М:Н определяли по величине отклонений от четков расчетной последовательности (9), оно соответствовало отношению с наименьшим отклонением.

Использовали два штамма асцитной опухоли Эрлиха. Штамм I был получен из Института онкологии и рентгенологии Минздрава АрмССР и 10 лет пассировался на кафедре биофизики биологического факультета ЕрГУ. Штамм II получен из Института экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР (ныне Онкологический научный центр АМН СССР).

Для перевивки брали асцитную жидкость у мышей с 10—12-дневной опухолью и вводили внутривенно по 0,2 мл. При введении дозированного количества опухолевых клеток подсчет последних проводили в камере Горяева. Клетки асцитной опухоли Эрлиха разрушали многократным замораживанием—оттаиванием в жидком азоте.

Результаты и обсуждение. Необходимо было выяснить изменяется ли изоферментный состав ЛДГ различных тканей мышей при развитии асцитной карциномы Эрлиха. С этой целью был определен изоферментный состав ЛДГ в головном мозге, печени, сердечной мышце мышей через 7 дней после введения им клеток асцитной карциномы Эрлиха (табл. 1).

Таблица 1
Изоферментный состав ЛДГ в тканях мышей опухоленосителей, $M \pm m$

Ткань		H_1	H_2M_1	H_2M_2	H_1M_2	M_4	М:Н	М, %
Мозг	о	$25 \pm 2,3$	$23 \pm 2,5$	$22 \pm 3,1$	21 ± 3	$9 \pm 0,9$	1:1	41,5
	к	25 ± 3	27 ± 1	27 ± 5	15 ± 2	$6 \pm 1,2$	1:2	37,5
Сердце	о	28 ± 3	$22 \pm 2,7$	26 ± 3	14 ± 2	$10 \pm 1,4$	1:2	39
	к	$25 \pm 2,4$	30 ± 2	23 ± 2	14 ± 2	$8 \pm 0,9$	1:2	37,5
Печень	о	1	$9 \pm 1,2$	13 ± 2	30 ± 2	$48 \pm 2,5$	6:1	79,25
	к	$0,93 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,8$	$11,1 \pm 1$	$80,6 \pm 2,2$	20:1	92,1

о—опыт, к—контроль.

Как видно из табл. 1, введение опухолевых клеток приводит к существенным изменениям в изоферментном составе ЛДГ только в печени, что выражается в значительном уменьшении процентного содержания М-субъединиц и уменьшении отношения М:Н.

В головном мозге и сердечной мышце наблюдается уменьшение содержания М-субъединиц, однако оно не так велико, и поэтому в дальнейших экспериментах нами исследовались изоферментные спектры только в печени.

С целью установления времени появления изменений были определены изоферментные спектры ЛДГ через разные промежутки времени после введения опухолевых клеток.

Как видно из данных, приведенных на рис., величина отношения М:Н, уменьшаясь до 3:1, вновь увеличивается, не достигая, однако, нормального уровня. Время появления этого феномена различно для

быстро и медленно развивающихся штаммов. Так, если быстро развивающийся штамм I вызывал уменьшение отношения М:Н от 20:1 до 3:1 через 6 час., и мыши гибли через 12—14 дней, то медленно развивающийся штамм II уменьшал это отношение до 4:1 через 12 час., а больные мыши гибли через 20—25 дней. Обнаружена зависимость величины отклонений в изоферментном составе ЛДГ печени от возраста штамма.

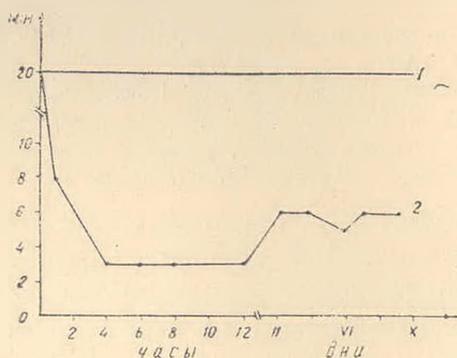


Рис. Изменение величины отношения М:Н печени в процессе развития асцитной карциномы Эрлиха. 1—контроль, 2—опыт.

Так, если введение $2,1 \cdot 10^6$ опухолевых клеток свежего штамма II через 6 час. увеличивало содержание Н-субъединиц до 11% (в контроле 7,25), то введение такого же количества опухолевых клеток штамма II, пассированного в течение 1 года (что приводило к ускоренному росту опухоли), повышало этот показатель до 15,75%. Если $8 \cdot 10^6$ клеток свежего штамма II через 6 час. после введения повышало содержание Н-субъединиц до 12%, то введение $5 \cdot 10^6$ клеток, пассированных в течение 1 года, до 24%. Через 12 час. после введения 10^7 опухолевых клеток штамма II, пассированного в течение года, отношение М:Н уменьшалось до 6:1, а после 1,5 лет пассирования—до 4:1 (табл. 2).

Таблица 2
Изоферментный состав ЛДГ печени через 12 час. после введения различных количеств опухолевых клеток (штамм II), $M \pm m$

Концентрация клеток, кл/мл	H_4	H_3M_1	H_2M_2	H_1M_3	M_4	Н, %	М:Н
$0,8 \cdot 10^6$	$2 \pm 0,5$	$6 \pm 0,5$	$10 \pm 2,2$	$13 \pm 2,9$	$69 \pm 4,8$	14,75	20:1
$2 \cdot 10^6$	$4 \pm 0,6$	$7 \pm 0,5$	$8 \pm 0,3$	$14 \pm 1,3$	$67 \pm 2,2$	19,25	10:1
10^7 (1 год)	6 ± 1	$10 \pm 1,5$	$13 \pm 2,5$	20 ± 2	51 ± 5	22,5	6:1
10^7 (1,5 года)	$6 \pm 0,6$	$12 \pm 2,1$	$17 \pm 0,8$	$28 \pm 1,8$	$37 \pm 0,9$	30,5	4:1

Поскольку изменения в изоферментном спектре ЛДГ проявляются рано, через 6—12 час., то их нельзя связывать с развитием опухоли. Можно предположить, что наблюдаемый эффект является реакцией ор-

ганизма на введение чужеродного белка. Однако введение различных количеств гомогената печени здоровой мыши и разрушенных замораживанием—оттаиванием клеток опухоли практически не вызывало изменений в изоферментном составе ЛДГ (табл. 3).

Таблица 3
Изоферментный спектр ЛДГ печени после введения гомогената
печени и разрушенных опухолевых клеток, М±тп

Время, час	Количество белка, γ	Н ₄	Н ₃ М ₁	Н ₂ М ₂	Н ₁ М ₃	М ₄	П, %	
Контроль	—	<1	2±0,5	10±2,5	11±3	76±3	10,25	
А	6	250	2±0,2	6±1,9	9±1,2	11±2,1	72±1,5	13,75
		450	1±0,4	5±0,8	7±1,1	10±2,1	77±3,1	10,75
		1200	2±0,8	5±1,5	6±1,5	11±2,1	76±5,8	11,5
Б	24	700	1±0,25	5±0,9	5±0,9	11±2,5	78±4	10
	6	2·10 ⁶	<1	3±0,9	7±0,9	18±2	72±1,9	11
		5·10 ⁶	<1	5±0,4	7±1,3	13±1,1	74±1,7	11,5

А—гомогенат печени, Б—разрушенные опухолевые клетки.

Следовательно, если разрушенные опухолевые клетки не вызывают резких изменений в изоферментном составе ЛДГ, то это может быть связано с реакцией организма на введение нативных клеток асцитной карциномы Эрлиха.

Увеличение количества Н-субъединиц при опухолях представляет большой интерес, тем более что подобные изменения были обнаружены и у человека при развитии опухолей молочной железы, желудка, легких [6]. Механизм этого явления не ясен. Подобную картину можно было объяснить разными скоростями диссоциации молекулярных форм ЛДГ, если бы общая активность ЛДГ не повышалась. Однако, как было нами показано, одновременно с увеличением содержания Н-субъединиц увеличивается и общая активность ЛДГ (табл. 4 и 5). Увеличение ее примерно в 2 раза говорит о возможных изменениях регуляции активности генов А и В, направляющих синтез М- и Н-субъединиц.

Исходя из полученных результатов, мы рассчитали величины изменений в активностях А и В генов, исключив любые другие возможные причины (разную скорость диссоциации молекул фермента, адсорбцию и десорбцию, активацию и инактивацию и т. д.).

Таблица 4
Зависимость изменений общей активности ЛДГ и активности генов А и В
от количества вводимых клеток опухоли

Концентрация клеток, кл./мл	А, %	М, %	М:Н	Х	У
Контроль	100	92,75	20:1	1	1
0,8·10 ⁶	105	85,25	20:1	2,03	0,97
2·10 ⁶	129	80,75	10:1	2,7	1,2
10 ⁷	158	69,5	4:1	4,2	1,4

Изменение общей активности ЛДГ и активности генов А и В при развитии асцитной карциномы Эрлиха (штамм 1)

Время	А, %	М, %	М:Н	Х	У
Контроль	100	92,1	20:1	1	1
1 час	138	85,25	8:1	1,9	1,3
4 часа	169	75,75	4:1	3,1	1,5
6 часов	177	68,75	3:1	3,9	2,1
8 часов	176	67,25	3:1	4,1	2,1
12 часов	176	65	3:1	4,4	2,2
24 часа	112	79,5	6:1	2,3	1
IV день	162	73,5	5:1	3,3	1,4
VI день	187	81,5	6:1	2,3	1,8
VII день	215	79,25	6:1	2,6	2,1
IX день	194	74	6:1	3,2	1,8

Итак, увеличение общей активности ЛДГ и изменение отношения М:Н связано с активацией и А, и В генов. При уменьшении отношения М:Н, в 5—6 раз, активность В гена увеличивается почти в 4 раза, а активность А гена и общая активность—в 2 раза.

Если же учесть, что печень является гетерогенной системой, состоящей из клеточных популяций двух типов, паренхимальных и купферовских, то при разной чувствительности их к введению опухолевых клеток может иметь место гораздо большая активация В гена.

Приняв, что количественное отношение паренхимальных и купферовских клеток в печени мышей такое же, как и в печени крыс, и равно 3:1 [12], можно рассчитать изоферментные спектры ЛДГ отдельных клеточных популяций и их возможные изменения, зная величину отношения М:Н для цельной печени.

Рассмотрим несколько вариантов. Во-первых, при введении опухолевых клеток активность генов в двух клеточных популяциях одинаково изменяется. При увеличении активности В гена в 7—10 раз изоферментный состав ЛДГ цельной печени может измениться от 20:1 до 3:1. Второй вариант—на введение асцита реагирует один тип клеток. Величина М:Н цельной печени может измениться лишь в том случае, если активность В гена увеличится в 20—50 раз в паренхимальных клетках, так как их в 3 раза больше, чем купферовских, и увеличение активности В гена в последних не вызывает столь резкого уменьшения отношения М:Н. Третий вариант—паренхимальные и купферовские клетки по-разному реагируют на введение опухолевых клеток. В этом случае в паренхимальных клетках синтез Н-субъединиц должен увеличиться в 5—10 раз, а в купферовских—в 2—3 раза (табл. 6).

Окончательный ответ на вопрос, как именно все происходит, мы можем дать только в том случае, если удастся разделить в печени мышей опухоленосителей купферовские клетки от паренхимальных и определить изменение изоферментного состава ЛДГ.

Таким образом, введение клеток асцитной карциномы Эрлиха приводит к очень быстрой реакции в печени мышей, величина и скорость которой зависят от количества клеток и скорости роста опухоли, что

Таблица 6

Отношение М:Н в гетерогенной системе

I/II	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1	6:1	7:1	8:1	9:1	10:1	20:1	40:1	60:1	80:1	100:1
1:1	1:1	2:1	2:1	3:1	4:1	4:1	5:1	5:1	6:1	6:1	8:1	10:1	20:1	20:1	20:1
2:1	1:1	2:1	3:1	3:1	4:1	5:1	5:1	6:1	6:1	7:1	9:1	20:1	20:1	20:1	20:1
3:1	2:1	2:1	4:1	4:1	4:1	5:1	6:1	6:1	6:1	7:1	10:1	20:1	20:1	20:1	20:1
4:1	2:1	2:1	4:1	4:1	4:1	5:1	6:1	7:1	7:1	8:1	10:1	20:1	20:1	20:1	20:1
5:1	2:1	3:1	4:1	4:1	5:1	5:1	7:1	7:1	7:1	8:1	10:1	20:1	20:1	20:1	20:1
6:1	2:1	3:1	4:1	5:1	5:1	6:1	7:1	8:1	8:1	9:1	10:1	20:1	20:1	20:1	40:1
7:1	2:1	3:1	4:1	5:1	5:1	6:1	7:1	8:1	9:1	9:1	20:1	20:1	40:1	40:1	40:1
8:1	2:1	4:1	4:1	5:1	6:1	6:1	7:1	8:1	9:1	9:1	20:1	20:1	40:1	40:1	40:1
9:1	2:1	4:1	4:1	5:1	6:1	7:1	8:1	9:1	9:1	10:1	20:1	20:1	40:1	40:1	40:1
10:1	2:1	4:1	4:1	5:1	6:1	7:1	8:1	9:1	9:1	10:1	20:1	20:1	40:1	40:1	40:1
20:1	2:1	4:1	4:1	5:1	6:1	8:1	9:1	10:1	10:1	10:1	20:1	40:1	40:1	40:1	60:1
40:1	2:1	4:1	5:1	6:1	7:1	8:1	9:1	10:1	10:1	20:1	20:1	40:1	60:1	60:1	80:1

I и II—две клеточные популяции, количественное отношение I:II=1:3.

выражается в активации генов А и В, направляющих синтез субъединиц ЛДГ, и в относительно большей степени—Н-субъединицы.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 15.11 1979 г.

ՄԿՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԼԱԿՏԱՏԳԵԶԻԳՐՈԳԵՆԱԶԻ ԻՉՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ
ԿԱԶՄԻ ՓՈՓՈխՈՒԹՅՈՒՆԸ ԷՌԼԻԽԻ ԱՍՑԻՏԱՅԻՆ ԿԱՐՑԻՆՈՄԱՅԻ
ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՆԵՐԱՐԿՈՒՄԻՑ ՀԵՏՈ

Ա. Վ. ՆԵՐԿԱՐԱՐՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Էռլիխի ասցիտային կարցինոմայի զարգացման ընթացքում դիտվում են լակտատդեհիդրոգենազի իզոֆերմենտների կազմի փոփոխությունների մկների գլխուղեղում, սրտամկանում և լյարդում: Առավել կտրուկ փոփոխություններ դիտվում են լյարդում:

Н-ենթամիավորի քանակի, լակտատդեհիդրոգենազի ընդհանուր ակտիվության և М:Н հարաբերության մեծացումը ի հայտ են գալիս ուռուցքային բջիջների ներարկումից 1 ժամ և հասնում են մաքսիմումի 6—12 ժամ հետո:

Փոփոխությունների մեծությունը և ի հայտ գալու արագությունը կախված են ասցիտային կարցինոմայի բջիջների քանակից և ուռուցքի աճի արագությունից:

Նման փոփոխություններ չի առաջացնում քայքայված ուռուցքային բջիջների և լյարդի հոմոգենատի ներարկումը:

THE CHANGES OF LACTATEDEHYDROGENASE ISOENZYMES
PATTERN IN MICE LIVER AFTER INJECTION OF EHRlich
ASCITES TUMOR CELLS

A. V. NERKARARIAN, G. H. PANOSYAN

The changes of lactatedehydrogenase isoenzymes patterns have been observed in brain, heart and liver of mice under the development of Ehrlich ascites carcinoma. The sharp changes have been observed in liver. The increase of quantity of H subunits, total lactatedehydrogenase activity and the change of M:H ratio in liver appear within an hour and reach the maximum in 6 or 12 hours after injection of tumor cells. The degree of changes depends upon quantity of ascites carcinoma cells and the rate of the tumor growth. No similar changes have been observed when injecting the destructed tumor cells and homogenate of liver.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агапова А. И. *Вопр. мед. химии*, 21, 3, 276—281, 1975.
2. Баева А. В., Шапиро Н. А. *Вопр. онкол.*, 16, 7, 101—107, 1970.
3. Бытка П. Ф., Мустяцэ Г. В., Андриуца К. А. *Клинич. медицина*, 52, 2, 85—88, 1974.

4. Голубев А. М., Чернухин А. А. *Вопр. онкол.*, 17, 8, 30—31, 1971.
5. Голубев А. М., Чернухин А. А., Шварц Я. И. *Вопр. онкол.*, 19, 9, 46—50, 1973.
6. Горожанская Э. Г., Шапог В. С. *Вест. АМН СССР*, 3, 28—32, 1971.
7. Комарова А. П., Суринов Б. П. *Мед. радиология*, 19, 3, 70—71, 1974.
8. Ломаченков В. Д., Аксенова О. Ф. *Клинич. медицина*, 52, 11, 47—52, 1974.
9. Паносян Г. А., Даниелян К. С. *Вопросы молекулярно-клеточной биологии*, 143, 1971.
10. Хайкина Б. И., Кузьминская У. А., Алехина С. М. *Бюлл. exper. биол. мед.*, 10, 39—41, 1970.
11. *Belitsky Ph., Elhiali M. M., Oliver J. A., Mackinnon K. J. J. Urol.*, 103, 6, 770—773, 1970.
12. *Berg T., Blix A. S. Nature new Biol.*, 245, 239—240, 1973.
13. *Damle S. R., Talavdekar R. V. Indian J. Cancer*, 11, 4, 419—432, 1974.
14. *Ditz A. A., Lubrano T. Annal. Biochem.* 20, 246—257, 1967.
15. *Fassaty M., Schon E., Fassaty P., Hucker J., Stepan J. Česk. Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 20, 2, 75—85, 1971.
16. *Fountain J. A., Parks M. E., Dickey A., McKee R. W. Cancer Res.* 30, 4, 998—1002, 1970.
17. *Ginsberg A. L. Amer. J. Dig. Dis.*, 15, 9, 803—807, 1970.
18. *Goldman R. D., Kaplan N. O., Hall T. C. Cancer Res.* 24, 389—399, 1964.
19. *Gotze M., Rossell I. Scand. J. Rheumatol.* 1, 4, 171—175, 1972.
20. *Jedličková J., Churý Zd. Vnitřní lěk.*, 18, 10, 949—957, 1972.
21. *Massey W. H., Dannis D. L., Fletcher W. S. Amer. J. Surg.*, 122, 2, 209—217, 1971.
22. *Tomoyuki I., Mori K., Usui T., Nihira H., Yasushi K. Urol. Int.*, 30, 6, 437—445, 1975.