

## КЛЕТОЧНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОТБОРА И ИЗУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ С АСПАРАГИНАЗНОЙ И ГЛУТАМИНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Ж. К. АСЛАНЯНЦ, Я. В. ДОБРЫНИН

Клеточные линии рака человека СаРа (карцинома поджелудочной железы) и лимфома Бёркитта—Р<sub>3</sub>НЕНР чувствительны к аспарагину и глутамину; клеточная линия СаОv (карцинома яичника) не чувствительна к этим аминокислотам.

Тест-система, состоящая из чувствительных к аспарагину и глутамину—СаРа и Р<sub>3</sub>НЕНР—и нечувствительной—СаОv—клеточных линий может использоваться для отбора и изучения специфической биологической L-аспарагиназной-глутаминазной активности и неспецифической цитотоксичности испытуемых ферментных препаратов.

Одним из ферментов, проявляющих специфический противоопухолевый эффект, является L-аспарагиназа [2—5, 8—10].

Для определения первичной оценки биологической активности препаратов используется метод монослойных и суспензионных клеточных культур [5—9]. Для проведения подобных испытаний необходимо создание тестирующей системы, состоящей из чувствительных и нечувствительных к специфическому действию препаратов клеток.

В статье приводятся результаты исследований по созданию тест-системы, чувствительной к специфической аспарагиназной и глутаминазной активности и неспецифическому цитотоксическому эффекту ферментных препаратов с аспарагиназной и глутаминазной активностью.

*Материал и методика.* Использовались две монослойные клеточные культуры—СаОv (карцинома яичников человека) и СаРа (карцинома поджелудочной железы человека) и одна стационарная взвешенная культура—лимфома Бёркитта (штамм Р<sub>3</sub>НЕНР), взятая из лаборатории иммунологии СНЦ

Критерием цитотоксического эффекта мы избрали действие препарата на уровень синтеза нуклеиновых кислот (в частности ДНК), так как цитостатики тормозят синтез нуклеиновых кислот независимо от того, действуют они непосредственно на этапы синтеза ДНК или опосредованно, через иные клеточные системы. Данный критерий отражает жизнедеятельность популяции клеток в целом. Цитотоксический эффект оценивали радиометрическим методом, определяя уровень включения клетками меченого тритием Н<sup>3</sup>-тимидина [1, 6]. Измерение радиоактивности производили с помощью сцинтилляционного счетчика «Интертекник». Гидролиз и экстракцию нуклеиновых кислот осуществляли по модифицированному методу [11]. Детали метода описаны ранее Добрыниным и соавт. [1]

В опытах с монослойными клеточными культурами СаОv и СаРа мы использовали синтетическую питательную среду № 199 с добавлением 10% от объема среды сыворотки крупного рогатого скота с антибиотиком канамидином (100 ед./мл). Инкубационная взвесь содержала 100 тыс. клеток/мл.

В опытах с суспензионной клеточной культурой лимфомы Бёркитта (штамм Р<sub>3</sub>НЕНР) использовалась синтетическая среда RPMI-1629 с добавлением 10% от объема среды телячьей эмбриональной сыворотки с антибиотиком мономицином (100 ед./мл). Инкубационная взвесь содержала около 500 тыс. клеток в 1 мл среды.

Приготовленные клеточные взвеси инкубировали с аспарагином, глутамином и  $\alpha$ -аспарагиназой фирмы Байер (ФРГ) при 37° в течение 24 час. (в случае с культурами СаОv и СаРа) и в течение 6 час. (в случае с культурой лимфомы Бёркитта).  $\alpha$ -аспарагиназа добавлялась к клеткам в концентрации 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 и 50 МЕ/мл.

Глутамин и аспарагин добавлялись в инкубационную взвесь в равноэквивалентных дозах—0,2 мг/мл. Кроме того, были проведены опыты с добавлением в инкубационную взвесь избытка аспарагина в дозе 0,5 мг/мл. Препараты добавлялись в среду Игла после отмыва клеточных культур.

*Результаты и обсуждение.* Результаты опытов с добавлением аспарагина и глутаминна в равноэквивалентных дозах к культуре клеток СаОv показали, что включение метки клетками практически не менялось (табл. 1).

Таблица 1  
Чувствительности культур клеток к аспарагину и глутамину

Условия опыта	Время инкубации, час.	Включение <sup>3</sup> H-тимидина		Достоверность, P
		расп./мин	% от контроля	
Среда Игла + клетки СаОv	24	19137±41	100	P<0,001
Среда Игла+глутамин+клетки СаОv	24	19102±22	99	P<0,005
Среда Игла+аспарагин+клетки СаОv	24	16601±38	84	P<0,001
Среда Игла+аспарагин+глутамин+клетки СаОv	24	23177±33	122	P<0,001

Добавление избытка аспарагина также существенно не влияло на этот показатель. Можно думать, что клетки культуры СаОv являются резистентными к дефициту аспарагина и глутаминна.

Добавление глутаминна и аспарагина в равноэквивалентных дозах к клеточным культурам СаРа и лимфоме Бёркитта выявило тенденцию к увеличению включения метки указанными клетками (табл. 2 и 3).

Из результатов, представленных в табл. 2 и 3, можно заключить, что клеточные культуры СаРа и лимфома Бёркитта чувствительны к дефициту аспарагина и глутаминна. При этом клетки культуры СаРа в большей степени аспарагинзависимы, а клетки культуры Р<sub>3</sub>НЕНР-глутаминзависимы.

Таким образом, клеточные культуры СаРа и Р<sub>3</sub>НЕНР, по-видимому, аспарагин- и глутаминзависимы и могут служить тестом для определения специфической биологической активности ферментных препаратов с аспарагин-глутаминазной активностью.

Наши данные о резистентности клеточной культуры СаОv к дефициту аспарагина и глутаминна, а также о чувствительности клеточной культуры клеток СаРа, полученной из карциномы поджелудочной железы человека, полностью совпадают с данными других авторов [3, 4].

Испытания ферментного препарата L-аспарагиназы из E. coli в до-

зах 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 и 50 МЕ/мл доказали, что краснитин в малых дозах (до 5,0 МЕ/мл) не оказывает существенного влияния на включение метки ни у культуры клеток СаОv, ни у культуры клеток СаРа. Однако в дозах 5,0 и 50 МЕ/мл он снижает уровень включения метки указанными культурами до 50%.

Результаты опытов, проведенных с препаратом L-аспарагиназы, показали, что выбор тест-системы, состоящей из чувствительной к аспарагиназе клеточной культуры СаРа, подтверждает наличие специфической биологической активности в препарате, а испытания на нечувствительной к дефициту аспарагина клеточной линии СаОv показали относительную степень очистки указанного фермента, что проявляется в неспецифической цитотоксичности препарата.

Таблица 2  
Чувствительность культур клеток СаРа к аспарагину и глутамину

Условия опыта	Время инкубации, час.	Включение Н <sup>3</sup> -тимина		Достоверность, P
		расп./мин	% от контроля	
Среда Игла+клетки СаРа	24	1389±700	100	P>0,1
Среда Игла+глутамин+клетки СаРа	24	1920±390	138	P<0,01
Среда Игла+аспарагин+клетки СаРа	24	1847±576	133	P=0,05
Среда Игла+глутамин+аспарагин+клетки СаРа	24	2189±547	157	P<0,05

Таблица 3  
Чувствительность клеток P<sub>3</sub>НЕНР к аспарагину и глутамину

Условия опыта	Время инкубации, час.	Включение Н <sup>3</sup> -тимидина		Достоверность, P
		расп./мин	% от контроля	
Среда Игла+клетки P <sub>3</sub> НЕНР	6	783±62	100	P=0,05
Среда Игла+глутамин+клетки P <sub>3</sub> НЕНР	6	1021±97	130	P=0,005
Среда Игла+аспарагин+клетки P <sub>3</sub> НЕНР	6	932±602	118	P>0,1
Среда Игла+аспарагин+глутамин+клетки P <sub>3</sub> НЕНР	6	1231±759	157	P=0,1

Таким образом, клеточные системы, состоящие из аспарагин- и глутаминзависимых (клеток поджелудочной железы человека—СаРа и лимфомы Беркитта—P<sub>3</sub>НЕНР) и аспарагин- и глутаминнезависимых (клеток культуры СаОv) клеточных линий могут быть использованы как тестирующие системы для дифференцировки специфической L-аспарагиназной и глутаминазной биологической активности от неспецифической цитотоксичности ферментных препаратов.

Ереванский государственный университет,  
кафедра биохимии

Поступило 9.IV 1979 г.

ԲՋՁԱՅԻՆ ՏԵՍՏ-ՍԻՍՏԵՄ ԱՍԳԱՐԱԴԻՆԱԶԱՅԻՆ ԵՎ ԳԼՈՒՏԱ-  
ՄԻՆԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՄԲ ՕԺՏՎԱԾ ՅԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ  
ՊՐԵՊԱՐԱՏՆԵՐԻ ԸՆՏՐՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

Ժ. Բ. ԱՍԼԱՆՅԱՆՑ, Յ. Վ. ԴՈԲՐԻՆԻՆ

Մարդու բաղցկեղային բջիջները CaPa (ենթաստամոքսային գեղձի կար-  
ցիոնոմա) և Բերկիտտի լիմֆոման -P<sub>3</sub>HEHR զգայուն են ասպարագինի  
և գլուտամինի նկատմամբ: CaOv (ծվարանի կարցիոնոմա) բջիջները զգա-  
յուն չեն այդ ամինաթթուների նկատմամբ:

Տեստ-սիստեման՝ բաղկացած ասպարագինի և գլուտամինի նկատմամբ  
զգայուն CaPa և P<sub>3</sub>HEHR բջիջներից և ոչ զգայուն բջիջներից կարող են ծա-  
ռայել կենսաբանական յուրահատուկ ակտիվություններ օժտված L-ասպարա-  
գինազայի և L-գլուտամինազայի ընտրության և ուսումնասիրման, ինչպես  
նաև այդ ֆերմենտների ոչ յուրահատուկ ցիտոտոքսիկ ազդեցության ուսում-  
նասիրման համար:

CELL TEST-SYSTEM FOR SCREENING AND STUDY OF  
FERMENTATIVE PREPARATIONS WITH ASPARAGINASE  
AND GLUTAMINASE ACTIVITY

G. K. ASLANIANTS, J. V. DOBRYNIN

Cell lines of human cancer CaPa (pancreas carcinoma) and Berkitf  
lymphoma P<sub>3</sub>HEHR are sensitive to asparagine and glutamine, while the  
cell line CaOv (ovary carcinoma) is not sensitive.

Test- system consisting of sensitive to asparagine and glutamine cell  
lines CaPa and P<sub>3</sub>HEHR and not sensitive cell line CaOv may be used  
for screening and study of specific biological L-asparaginase-glutaminase  
activity and nonspecific cytotoxicity of tested preparations.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Добрынин Я. В., Монатова Т. И., Кондратьева Н. А. Лабор. дело, 3, 143, 1974.
2. Кондратьева Н. А. Канд. дисс. М., 1974.
3. Кондратьева Н. А., Добрынин Я. В., Меркулов М. Ф. Антибиотики, 11, 994, 1977.
4. Кондратьева Н. А., Добрынин Я. В., Меркулов М. Ф. Антибиотики, 2, 122, 1978.
5. Смирнов А. Н. Проблемы гематологии и переливания крови, 8, 62, 1970.
6. Стеняева (Монатова) Т. И. Канд. дисс., М., 1973.
7. Adel A. Yunis, Grace K. Arimura and David J. Russin. Internat. J. of Cancer 19, 1, 128, 1977.
8. Broome J. D. Nature, 191, 1114, 1961.
9. Broome J. D. J. Nat. Cancer Inst. 35, 967, 1965.
10. Burchenal J. H. Cancer Res., 29, 12262, 1969.
11. Ogur M., Rosen G. Arch. Biochem, 25, 262, 1950.