

УДК [557.12:616—006]:59

ДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ НА ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Г. А. ПАНОСЯН, А. В. НЕРҚАРАЯН

Исследовано действие гидрокортизона и инсулина на изоферментный спектр и общую активность лактатдегидрогеназы печени мышей. Оба препарата снижают общую активность фермента и содержание гомотетрамеров H_4 и M_4 , содержание гетеротетрамеров резко увеличивается.

Гормоны ослабляют действие клеток асцитной карциномы Эрлиха на изоферментный спектр лактатдегидрогеназы печени.

Ключевые слова: изоферменты ЛДГ, опухолеобразование, гидрокортизон, инсулин.

При исследовании изоферментных спектров лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в отдаленных от опухоли тканях при развитии асцитной карциномы Эрлиха у мышей [5] и карциносаркомы Уокера у крыс [6] нами были обнаружены изменения, указывающие на нарушение генетической регуляции синтеза ЛДГ печени.

С точки зрения выяснения механизмов возникновения нарушений большой интерес представляет исследование изоферментного спектра ЛДГ печени после введения опухолевых клеток в условиях измененного гормонального статуса организма. В настоящее время считается доказанным, что гормоны в комплексе с белками-рецепторами участвуют в процессах внутриклеточной регуляции синтеза белка. Так, например, гидрокортизон и инсулин увеличивают Mg^{2+} - и Mn^{2+} -зависимую РНК-полимеразу в ядрах печени крыс [4, 10], изменяют изоферментный состав пируваткиназы и ЛДГ [1, 3, 7] и т. д. С другой стороны, гидрокортизон является активным противоопухолевым препаратом, физиологические концентрации которого замедляют рост опухоли [8, 9, 11], и, что особенно важно, действие его максимально проявляется на начальной стадии развития опухоли [2].

Настоящая работа посвящена изучению изоферментного спектра ЛДГ печени мышей после введения клеток асцитной карциномы Эрлиха в условиях измененного гормонального статуса организма.

Материал и методика. Опыты проводились на белых беспородных мышах массой 20—25 г. Были использованы растворы гидрокортизона фирмы «Рихтер» и инсулина отечественного производства. Животным вводили по 107 клеток асцитной карциномы Эрлиха и гормоны за час до введения опухолевых клеток: гидрокортизон—подкожно по 50 мг/кг, инсулин—внутрибрюшинно по 10 ед./кг веса. Через 30 мин после инсулина вводили по 0,5 мл 40%-ного раствора глюкозы. Животных забивали через 12 ч после введения опухолевых клеток.

При инкубации клеток с гормонами *in vitro* использовали три дозы каждого гормона, рассчитанные на 10^7 клеток опухоли: гидрокортизон—1, 0.1, 0.01 мг; инсулин—0.2, 0.02, 0.002 ед.

Опухолевые клетки инкубировали в физиологическом растворе и с гормонами при 37° в течение часа, промывали физиологическим раствором, суспензировали в нем и вводили внутривенно по 10^7 клеток.

Мышей забивали через 12 часов.

Перевивку опухоли, получение ЛДГ-активных тканевых экстрактов, электрофоретическое разделение изоферментов и определение активности ЛДГ (А) проводили методами, описанными ранее [5].

Для определения степени изменений в изоферментном спектре ЛДГ печени при введении опухолевых клеток, наряду с предложенным ранее коэффициентом X [5], мы использовали еще один показатель—K, рассчитываемый по формуле

$$K = \frac{a_1 \cdot A_1}{a_0 \cdot A_0}, \text{ а } X = \frac{a_1}{a_0},$$

где a_0 и a_1 —процентное содержание Н-субъединиц в контроле и в опыте, A_0 и A_1 —общая активность ЛДГ в контроле и в опыте соответственно.

При использовании коэффициента K наблюдаемый эффект должен выявляться резко, так как при этом учитывается и изменение общей активности ЛДГ.

Результаты и обсуждение. Исследование изоферментного спектра ЛДГ печени мышей при развитии асцитной карциномы Эрлиха выявило изменения, возможной причиной которых являются нарушения на уровне генома, выражающиеся в изменении величины отношения активностей генов А и В, отношения их генопродукта М:Н, увеличении общей активности ЛДГ и содержания Н-субъединиц [5].

Необходимо было выяснить, изменяется ли реакция организма на введение опухолевых клеток при воздействии такими биологически активными веществами, как гормоны. С этой целью был определен изоферментный состав ЛДГ печени мышей после инъекции гидрокортизона и инсулина до введения опухолевых клеток. Контрольным группам животных вводили гидрокортизон и инсулин без опухолевых клеток.

Результаты экспериментов представлены в табл. 1, из данных которой видно, что инсулин приводит к увеличению содержания Н-субъединиц, введение опухолевых клеток через час после гормона практически не изменяет этой картины. Возможно, инсулин нарушает равновесие между диссоциацией и ассоциацией М- и Н-субъединиц, стабилизирует гетеротетрамеры, не затрагивая генетической регуляции синтеза субъединиц.

Введение гидрокортизона также приводит к значительным изменениям в изоферментном спектре. Увеличивается содержание Н-субъединиц, резко повышается содержание гетеротетрамеров: ЛДГ-2 (почти в 2 раза), ЛДГ-3 и ЛДГ-4 (почти в 3 раза). Содержание ЛДГ-5 уменьшается в 2 раза, а ЛДГ-1—практически не меняется. Опухолевые клетки, введенные через час после гидрокортизона, увеличивали содержание Н-субъединиц до 25,5%. По-видимому, гормон уменьшает, но полностью не снимает действия опухолевых клеток на печень мышей.

Изоферментный спектр ЛДГ печени при введении гормонов и опухолевых клеток. $M \pm m$

| Серии | H_4 | H_3M_1 | H_2M_2 | H_1M_3 | M_4 | Н, % |
|-------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------|
| Н | $0,9 \pm 0,1$ | $1,8 \pm 0,3$ | $5,6 \pm 0,8$ | $11,1 \pm 1,0$ | $80,6 \pm 2,2$ | 7,8 |
| О | $6,1 \pm 0,5$ | $12,3 \pm 1,5$ | $17,4 \pm 0,7$ | $28,2 \pm 1,8$ | $36,0 \pm 1,5$ | 31,1 |
| И | 0 | $3,0 \pm 0,1$ | $12,7 \pm 0,5$ | $21,5 \pm 0,9$ | $62,8 \pm 1,4$ | 14,0 |
| И+О | 0 | $3,9 \pm 0,1$ | $12,3 \pm 0,6$ | $21,4 \pm 1,2$ | $62,4 \pm 1,7$ | 14,4 |
| ГК | 0,5 | $3,7 \pm 0,2$ | $18,0 \pm 0,9$ | $29,6 \pm 1,1$ | $48,2 \pm 1,2$ | 19,7 |
| ГК+О | $2,5 \pm 0,1$ | $9,4 \pm 0,5$ | $15,3 \pm 0,8$ | $33,1 \pm 1,4$ | $39,7 \pm 1,1$ | 25,5 |

Н—норма, О—после введения опухолевых клеток, И—инсулина, И+О—инсулина и опухолевых клеток, ГК—гидрокортизона, ГК+О—гидрокортизона и опухолевых клеток, Н, %—процентное содержание Н-субъединиц.

Было исследовано также действие гормонов на опухолевые клетки в опытах *in vitro*. Клетки асцитной карциномы Эрлиха вводили мышам после инкубации с гидрокортизоном и инсулином (табл. 2). Инкубированные опухолевые клетки вводили также контрольным группам

Таблица 2

Изоферментный спектр ЛДГ после введения инкубированных с гормонами опухолевых клеток, $M \pm m$

| Варианты | H_4 | H_3M_1 | H_2M_2 | H_1M_3 | M_4 | Н, % |
|----------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|------|
| А | $4,2 \pm 0,3$ | $9,7 \pm 0,5$ | $12,8 \pm 0,9$ | $25,6 \pm 1,2$ | $47,7 \pm 1,5$ | 24,3 |
| Б I | 0,1 | $1,8 \pm 0,1$ | $8,9 \pm 0,6$ | $13,5 \pm 0,7$ | $75,7 \pm 2,1$ | 9,3 |
| II | 0 | 0 | $9,5 \pm 0,3$ | $15,0 \pm 1,1$ | $75,5 \pm 1,9$ | 8,5 |
| III | 0,1 | $2,0 \pm 0,2$ | $12,5 \pm 0,8$ | $18,8 \pm 1,4$ | $66,6 \pm 2,2$ | 12,6 |
| В I | 0 | $1,1 \pm 0,1$ | $7,7 \pm 0,4$ | $12,8 \pm 0,8$ | $78,4 \pm 2,4$ | 7,9 |
| II | 0,2 | $2,4 \pm 0,3$ | $10,8 \pm 0,7$ | $12,5 \pm 0,6$ | $74,1 \pm 1,9$ | 10,5 |
| III | 0,3 | $3,0 \pm 0,1$ | $12,3 \pm 0,5$ | $19,5 \pm 0,9$ | $64,9 \pm 2,1$ | 13,6 |

А—после введения инкубированных в физиологическом растворе опухолевых клеток, Б—инкубированных с инсулином (I—0,2, II—0,02, III—0,002 ед./10⁷ кл.), В—инкубированных с гидрокортизоном (I, II—0,1, III—0,01 мг/10⁷ кл.).

мышей, которых оставляли для определения прививаемости опухоли. В контрольных группах опухоль прививалась только в случае инкубирования опухолевых клеток с гидрокортизоном в дозе 0,001 мг/10⁷ клеток и с инсулином в дозе 0,002 ед./10⁷ клеток. Однако рост опухоли задерживался и первые признаки ее появления отмечались через 17—20 дней; введение неинкубированных опухолевых клеток вызывало появление этих признаков через 5—6 дней.

Как видно из табл. 2, инкубация опухолевых клеток в физиологическом растворе в течение часа при 37° приводит к некоторому ослаблению их действия на изоферментный спектр ЛДГ печени мышей. Если неинкубированные опухолевые клетки увеличивали содержание Н-субъединиц до 31,1, то инкубированные—до 24,3%.

Предварительное инкубирование *in vitro* опухолевых клеток с большими дозами гидрокортизона и инсулина полностью снимало активи-

рующее действие опухолевых клеток (I и II варианты экспериментов). Малые дозы гормонов слабее действуют на клетки асцитной карциномы Эрлиха и последние почти в 2 раза увеличивают содержание Н-субъединиц.

Таким образом, результаты, представленные в табл. 2, дают возможность предположить, что фактор, оказывающий дестабилизирующее действие на регуляцию активности генов, направляющих синтез Н- и М-субъединиц ЛДГ, чувствителен к действию гидрокортизона и инсулина.

По-видимому, изменение изоферментного спектра ЛДГ печени после введения инсулина и опухолевых клеток (И+О в табл. 1) отражает лишь влияние гормона на печень, и доза 10 ед./кг полностью снимает действие опухолевых клеток.

Одновременно с изоферментным спектром ЛДГ определялась и общая активность фермента. Как инсулин, так и гидрокортизон уменьшают общую активность ЛДГ. На основании данных, полученных при определении общей активности и изоферментного спектра ЛДГ, мы считали величины изменений, вызываемых гормонами и опухолевыми клетками.

Таблица 3
Действие гормонов на опухолевые клетки и печень мышей *in vivo* и *in vitro*

| Серии | А, % | Н, % | Х | К |
|-----------------------------------|------|------|-----|-----|
| Норма | 100 | 7,8 | 1,0 | 1,0 |
| Опухолевые клетки | 176 | 31,1 | 4,0 | 7,0 |
| Опухолевые клетки, н. ф.* | 128 | 24,3 | 3,0 | 3,8 |
| Гидрокортизон <i>in vivo</i> | 95 | 19,7 | 2,5 | 2,4 |
| Гидрокортизон + опухолевые клетки | 94 | 25,5 | 3,2 | 3,0 |
| Гидрокортизон <i>in vitro</i> | | | | |
| 1 мг/10 ⁷ кл. | 102 | 7,9 | 1,0 | 1,0 |
| 0,1 мг/10 ⁷ кл. | 112 | 10,5 | 1,3 | 1,4 |
| 0,01 мг/10 ⁷ кл. | 114 | 13,6 | 1,7 | 1,9 |
| Инсулин <i>in vivo</i> | 93 | 14,0 | 1,8 | 1,6 |
| Инсулин + опухолевые клетки | 109 | 14,4 | 1,8 | 1,8 |
| Инсулин <i>in vitro</i> | | | | |
| 0,2 ед./10 ⁷ кл. | 98 | 9,3 | 1,1 | 1,1 |
| 0,002 ед./10 ⁸ кл. | 110 | 8,5 | 1,1 | 1,2 |
| | 115 | 12,6 | 1,6 | 1,8 |

н. ф.*—опухолевые клетки, инкубированные в физиологическом растворе.

Как видно из табл. 3, нативные опухолевые клетки увеличивают синтез Н-субъединиц (Х) в 4 раза, а инкубированные в физиологическом растворе—в 3 раза. Гидрокортизон и инсулин также увеличивают содержание Н-субъединиц, но общая активность при этом уменьшается, величина К достигает лишь 2,4 и 1,6 соответственно. Так как печень является тканью с анаэробным метаболизмом и в ней преобладают М-формы ЛДГ, общая активность последней фактически отражает содержание М-субъединиц. Следовательно, уменьшение общей активности фермента, наблюдаемое при действии гормонов, указывает на

уменьшение синтеза М-субъединиц, за счет чего и увеличивается процентное содержание И-субъединиц в изоферментном спектре ЛДГ. Возможно также, что наряду с угнетением синтеза М-субъединиц гормоны активируют синтез И-субъединиц.

Об угнетении синтеза М-субъединиц и уменьшении общей активности ЛДГ печени и красных скелетных мышц при введении гидрокортизона имеются данные в литературе [7].

Значительное увеличение коэффициента К, по-видимому, характерно для опухолевых клеток, по величине К можно судить, вероятно, о том, вызваны ли изменения в изоферментном спектре и общей активности ЛДГ действием опухолевых клеток или они являются результатом влияния других факторов, в частности гормонов, на клетки печени.

Подтверждением этого предположения являются результаты анализа величин К, рассчитанных для изоферментных спектров ЛДГ печени при введении инкубированных с гормонами опухолевых клеток.

Таким образом, полученные результаты дают возможность предположить, что фактор (или факторы), вызывающий нарушения регуляции на уровне генома, чувствителен к гидрокортизону и инсулину, и введение гормонов приводит к значительному уменьшению либо полному ингибированию действия опухолевых клеток на изоферментный спектр ЛДГ печени мышей.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 7.V 1980 г.

ՀՈՐՄՈՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԿՆԵՐԻ ԼՅԱՐԳԻ ԼԱԿՏԱՏԻՆԵԶԻԴՐՈՆ-ԳԵՆԱԶԻ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏՆԱՅԻՆ ԿԱԶՄԻ ՎՐԱ ԷՐԼԻԽԻ ԱՍՑԻՏԱՅԻՆ ԿԱՐՑԻՆՈՄԱՅԻ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՆԵՐԱՐԿՎԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Ա. Վ. ՆԵՐԿԱՐԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է հիդրոկորտիզոնի և ինսուլինի ազդեցությունը մկների լյարդի լակտատդեհիդրոգենազի (ԼԴՀ) իզոֆերմենտային կազմի և ընդհանուր ակտիվության վրա: Հիդրոկորտիզոնը և ինսուլինը փոքրացնում են ԼԴՀ-ի ընդհանուր ակտիվությունը, ինչպես նաև H_4 և M_4 հոմոտետրամերների պարունակությունը: Դիտվում է ճետերոտետրամերների պարունակության կրտուկ ավելացում: Հոմոմերները թուլացնում են էրլիխի ասցիտային կարցինոմայի բջիջների ազդեցությունը լյարդի ԼԴՀ-ի իզոֆերմենտային կազմի վրա:

**THE EFFECT OF HORMONES ON MICE
LACTATEDEHYDROGENASE ISOENZYME PATTERN UNDER
INJECTION OF EHRlich ASCITES TUMOR CELLS**

G. H. PANOSYAN, A. V. NERKARARIAN

The effect of cortisol and insulin on mice liver lactatedehydrogenase (LDH) isoenzyme pattern and total LDH activity, influence of hor-

mone injection on the effect of Ehrlich ascites tumor cells on the LDH isoenzyme pattern of liver have been investigated. Cortisol and insulin decrease the total activity of LDH and content of homotetramers H_4 and M_4 , the content of heterotetramers increases sharply. Hormones weaken the effect of Ehrlich ascites tumor cells on liver LDH isoenzyme pattern.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калиман П. А., Амири А. А. Актуальные проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики. 62—68, Киев, 1979.
2. Кильдема Л. А. *Вопр. мед. химии*, 25, 1, 36—41, 1979.
3. Кожевникова К. А. *Вопр. мед. химии*, 25, 2, 171—176, 1979.
4. Маковоз Р. К., Зильберман С. Ц. Актуальные проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики. 86—88, Киев, 1979.
5. Неркарян А. В., Паносян Г. А. *Биолог. ж. Армении*, 32, 4, 337—345, 1979.
6. Неркарян А. В., Паносян Г. А. *Биолог. ж. Армении*, 32, 11, 1098—1103, 1979.
7. Цапко Л. И., Усатенко М. С. *Биохимия*, 38, 1, 156—160, 1973.
8. De Loecker W., Leyman A. M., Wever F. *Biochem. Soc. Trans.*, 6, 6, 1237—1238, 1978.
9. Gambartni A. G., Funck S. T. S., Armelin H. A. *Rev. brasil. biol.*, 39, 3, 671—676, 1979.
10. Martin H., Martin R., Walther S. *Vth. Eur. Symp. Basic Res. Gerontol.* Weimar, 1976, Erlangen, 606—613, 1977.
11. Milholland R. J., Margot M., Rosen F. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 88, 3, 993—997, 1979.