ТЕСТИРУЮЩАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ
 АКТИВНОСТИ L-АСПАРАГИНАЗ

Ж. К. АСЛАНЯНЦ, М. А. ДАВТЯН, Я. В. ДОБРЫНИН, К. Р. СТЕПАНЯН

Тестирующая система, состоящая из клеточных культур СаОv—rHeLa и асцитной опухоли (лимфосаркомы Фишера), может служить для определения биологической и противоопухолевой активности ферментных препаратов, обладающих аспарагиназной и глутаминазной активностью.

L-аспарагиназа из *Ps. aurantiaca* обладает биологической активностью и тенденцией к противоопухолевой активности.

Ключевые слова: тест-система, культура клеток, биологическая и противоопухолевая активность, L-аспарагиназа.

Как известно, для отбора и изучения препаратов с предполагаемой противоопухолевой активностью широко используется метод клеточных культур [12, 13]. Выбор тестирующей системы клеток зависит от задач эксперимента. Так, было показано [1, 6], что для определения биологической активности L-аспарагиназ можно использовать клеточные системы, состоящие из чувствительных и нечувствительных к аспарагину клеток. Однако для выявления противоопухолевой активности у ферментов, обладающих биологической активностью, необходимо провести дальнейшее их изучение на адекватных моделях экспериментальных животных.

Целью настоящего исследования является подбор тест-системы для определения биологической и противоопухолевой активности ферментных препаратов с аспарагиназной и глутаминазной активностью.

Материал и методика. Мы использовали две монослойные клеточные культуры СаОv—карцинома яичников и HeLa—рак шейки матки человека и одну взвешенную стационарную культуру—лимфому Беркитта (штамм Р₃НЕНР).

Критерием цитотоксического эффекта служило действие препарата на уровень синтеза нуклеиновых кислот независимо от того, действуют ли они непосредственно на этапы синтеза ДНК или опосредованно, через иные клеточные системы. Метод подробно описан Добрыниным и сотр. [1, 4—7].

Нами испытывались L-аспарагиназа—2 с глутаминазной активностью 1:2 из *Ps. aurantiaca* (ИБФМ-В-14) (Института биохимии ферментов и микроорганизмов АН СССР), активность фермента составляла 50 МЕ на 1 мг белка, молекулярная плотность—150000—180000 [2], а также L-аспарагиназа, выделенная из *Candida guilliermondii* ВКМ-У-42 (Ереванский государственный университет). Последний дап на испытание после частичной очистки (в 60 раз). При этом аспарагиназная активность

составляла 0,05 МЕ на 1 мг белка, глутаминовая активность—8—12% от аспарагиназной активности, молекулярная плотность—195000 [3]. Контролем служила L-аспарагиназа (краснитин) из E. coli фирмы Байер (ФРГ).

Ферменты испытывались на клеточных культурах: СаОv, HeLa и P₃HEHR. Препарат, проявивший биологическую активность, подвергался дальнейшему испытанию на противоопухолевую активность на мышах. В эксперименте использовались мышьяк-самцы массой около 20 г линии ДВА₂, которым вводили внутривентриально асцитные клетки L-8 (лимфолейкоз Фишера) в объеме 0,2 мл. Через 2 недели после развития опухоли мышей забивали, вскрывали и тотчас отсасывали из брюшной полости асцит. Затем асцит разбавляли в 2 раза синтетической питательной средой № 199. Приготовленную клеточную взвесь по 0,2 мл с содержанием 1·10⁶ клеток вводили внутривентриально мышам-самцам линии С₅₇ В1 массой около 20 г.

Через 24 ч после прививки мышам асцита начинали лечение их L-аспарагиназами в течение 3-х дней ежедневно. Ферменты вводили внутривентриально в дозе 10 МЕ на мышшь, т. е. 0,5 МЕ/г массы тела. Доза была выбрана исходя из того, что лечебная доза L-аспарагиназы составляет 500—1000 МЕ/кг массы тела.

Критерием противоопухолевой активности служила средняя продолжительность жизни животных.

Результаты и обсуждение. Предварительные испытания клеток СаОv, P₃HEHR и СаРа на чувствительность их к дефициту аспарагина показали, что клеточная линия СаОv—не чувствительна к дефициту аспарагина и глутамин, а клеточные линии СаРа и P₃HEHR чувствительны к нему [1]. В указанной работе нами было показано также, что для определения специфической биологической активности аспарагиназ можно использовать клеточные системы СаОv—СаРа, и СаОv—P₃HEHR. В этих тестирующих системах клеточная культура СаОv, не чувствительная к дефициту аспарагина и глутамин, используется для определения общей цитотоксичности ферментов, чувствительные к дефициту их клеточные культуры СаРа и P₃HEHR—для определения специфической цитотоксичности. Опыты показали, что клетки HeLa чувствительны к дефициту аспарагина, так как включение метки повышалось на 100%, т. е. в 2 раза, после прибавления избытка аспарагина к клеточной культуре HeLa (табл. 1, строка 4).

Таблица I
Определение чувствительности клеточных культур СаОv и HeLa к дефициту аспарагина

Условия опыта	Время инкубации, час	Включение Н ³ -тимидина		Коэффициент Стюдента
		расп/мин	% от К	
Среда Игла + кл. культура СаОv	24	2035±574	100	3,5
Среда Игла + кл. культура СаОv + аспарагин	24	2561±285	125	9,0
Среда Игла + кл. культура HeLa	24	1200±228	100	5,0
Среда Игла + кл. культура HeLa + аспарагин	24	2381±594	198	4,0

Затем мы приступили к испытаниям аспарагиназ с целью установления их биологической активности, а также для проверки тест-системы:

CaOv—HeLa. Все 3 вида аспарагиназы добавлялись к клеточным культурам в дозе 5,0 МЕ/мл. L-аспарагиназа-глутаминаза ИБФМ-В-14 тормозит включение метки на чувствительных к дефициту аспарагина клетках HeLa почти на 50% (табл. 2, строка 6), что говорит о наличии в препарате специфической цитотоксичности. Снижение же включения метки клетками культуры CaOv под влиянием фермента указывает на наличие в препарате общей цитотоксичности. Специфическая цитотоксичность L-аспарагиназы-глутаминазы ИБФМ-В-14 оказалась выше специфической цитотоксичности L-аспарагиназы (краснитин) фирмы Байер (табл. 2).

Таблица 2
Влияние аспарагиназы на клеточные культуры CaOv и HeLa

Условия опыта	Время инкубации, час	Включение Н ³ -тимидина		Коэффициент Стьюдента
		расп мин	% от К	
Среда Игла + кл. культура CaOv	24	2035±574	100	3,5
Среда Игла + кл. культура CaOv + +5 МЕ/мл L-аспарагиназы (краснитин)	24	2187±497	107	4,0
Среда Игла + кл. культура CaOv + +5 МЕ/мл L-аспарагиназы (ИБФМ-В-14)	24	1347±197	66	7,0
Среда Игла + кл. культура HeLa	24	1200±228	100	5,0
Среда Игла + кл. культура HeLa + + 5 МЕ/мл L-аспарагиназы (краснитин)	24	1037±273	89	4,0
Среда Игла + кл. культура HeLa + +5 МЕ/мл L-аспарагиназы (ИБФМ-В-14)	24	683±70	57	10,0

Испытания же ферментного препарата L-аспарагиназы из *Candida guilliermondii* ВКМ-У-42 ввиду малой активности (0,05 МЕ на 1 мг белка), а также ограниченного количества его, нам удалось провести лишь на одной клеточной культуре—лимоме Беркитта, чувствительной к дефициту аспарагина [1]. При этом метка снизилась на 44% от контроля, что дает нам основание предполагать наличие в препарате специфической цитотоксичности.

Поскольку препарат аспарагиназы (ИБФМ-В-14) из *Ps. aurantiaca* проявил специфическую цитотоксичность, мы подвергли его испытаниям на противоопухолевую активность *in vivo* на мышах. Асцитный тип опухоли нами выбран на основании многочисленных данных литературы [8, 9, 14, 18] и др., указывающих на то, что этот тип опухоли является наиболее адекватным для первичной оценки противоопухолевой активности исследуемых препаратов. Мы использовали в своих исследованиях асцитный тип опухоли (лимфолейкоз Фишера). Опыты *in vivo* показали, что средняя продолжительность жизни животных под влиянием L-аспарагиназы из *Ps. aurantiaca* удлинялась на 20—30% по сравнению с контролем, а под влиянием L-аспарагиназы (краснитин)—на 30—40%.

Таким образом, ферментный препарат L-аспарагиназы из *Ps. aurantiaca* имеет тенденцию к противоопухолевой активности. Наши данные о наличии в препаратах аспарагиназы противоопухолевой активности согласуются с многочисленными данными литературы [10, 15] и др. Данные же, полученные нами при определении чувствительности клеток HeLa к дефициту аспарагина, полностью согласуются с данными Кима [11]. Мы наблюдали корреляцию результатов по биологической и противоопухолевой активности L-аспарагиназы из *Ps. aurantiaca* как *in vitro*, так и *in vivo*.

Выражаем свою признательность научному сотруднику Института биохимии ферментов и микроорганизмов АН СССР (г. Пущино) Виноградову Б. Д. за предоставленный нам на испытание препарат L-аспарагиназы-2 (ИБФМ-В-14). Выражаем также искреннюю благодарность сотрудникам Онкологического научного центра г. Москвы группы клеточной фармакологии (рук. гр. Добрынин Я. В.), Т. Г. Николаевой и Т. П. Пунтус за помощь в работе над освоением методик.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии

Поступило 22.II 1980 г.

ՏԵՍՏ ՍԻՍՏԵՄ Լ-ԱՍՊԱՐԱԴԻՆԱԶԱՅԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ԵՎ ՀԱԿԱՌԻՌՈՒՅՔԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՀԱՐՅԻ ՎԵՐԱՔԵՐՅԱԼ

Ժ. Բ. ԱՍԼԱՆՅԱՆՅ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Յա. Վ. ԴՈԲՐՆԻՆ, Կ. Ռ. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ

Մարդու արգանդի վզիկի բջջային կուլտուրան՝ HeLa-ն զգայուն է ասպարազինի նկատմամբ:

CaOv-HeLa-ի բջջային տեստ-սիստեմը կարող է օգտագործվել ասպարազինազային և գլուտամինազային ակտիվությունը օժտված ֆերմենտային պրեպարատների կենսաբանական ակտիվությունը որոշելու համար, իսկ CaOv-HeLa-ի և Ֆիշերի լիմֆոսարկոմայի ասցիտային ուռուցքի բջիջներից կազմված տեստ-սիստեմը կարող է ծառայել այդ պրեպարատների ինչպես կենսաբանական, այնպես էլ հակաուռուցքային ակտիվության որոշման համար:

Pseudomonas aurantiaca-ի L-ասպարազինազան օժտված է կենսաբանական և հակաուռուցքային ակտիվությամբ:

TEST SYSTEM FOR DETERMINATION OF BIOLOGICAL AND ANTITUMOR ACTIVITY OF L-ASPARAGINASE

G. K. ASLANYANTS, M. A. DAVTYAN, J. V. DOBRYNIN, K. R. STEPANIAN

Cell test system consisting of cell culture CaOv-HeLL and ascite tumor may be used for determination of biological and antitumor activity of enzyme preparations with asparaginase and glutaminase activity. L-asparaginase of *Ps. aurantiaca* has biological and antitumor activity.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Асланянц Ж. К., Добрынин Я. В., Биолог. ж. Армении, 34, 9, 912—915, 1979.
2. Виноградов Б. Д., Чигалейчик А. Г., Пириева Д. А., Ушаков В. М., Рылкин С. С. Микробиология, 40, 1, 23—27, 1976.
3. Давтян М. А., Степанян К. Р., Оганесян С. П., Биолог. ж. Армении, 30, 2, 14—19, 1977.
4. Добрынин Я. В., Монатова Т. И., Кондратьева Н. А. Лабор. дело, 3, 143, 1974.
5. Кондратьева Н. А. Канд. дисс. М., 1974.
6. Кондратьева Н. А., Добрынин Я. В., Меркулов М. Ф. Антибиотики, 2, 122, 1978.
7. Стеняева Т. И. (Монатова) Канд. дисс., М., 1973.
8. Di Paolo J. A., Moore G. E. Ann. N. Y. Acad. Sci., 76, 870, 1958.
9. Eagle H., Foley E. Ann. J. Med., 21, 739, 1956.
10. Giovanni Brambilla, Silvio Parodi, Marro Cavanna Carlo E. Caraceni and Luciano Baldini Cancer Res, 30, 2665, 1970.
11. Kim J. H., Boyse E. A., Old L. J., Campbell H. A. Biochem. et biophys. acta, 158 3, 476, 1968,
12. Nahas Alv., Capazzi Robert L. Cancer Res., 34, 10, 26, 89—2693, 1974.
13. Nakashima Tadashi, Kuwano Michiluko, Akiyama Shin-ichi, Endo Hideya Cancer. Res, 36, 10, 3616, 1976.
14. Sigiura Kanematsu, Ann. N. Y. Acad. Sci, 76, 3, 575, 1958.
15. Schwartz James H., Recves Jane Y., Broome John D. Proc. Nat. Acad. Sci USA 56, 15, 1516, 1966.
16. Walker D. G., Lyons M. M., Wright J. C. Europ. J. Cancer, 1, 265, 1965.
17. Wright J. C., Cobb J. P., Gumpert S. L. et al. Cancer, 15, 284, 1962.
18. Wright J. C., Walker Dorothy J. Surg. Oncol., 7, 5, 361, 1975.