

УДК 615.277.3

А. В. НЕРКАРЯН, Г. А. ПАНОСЯН

ДЕЙСТВИЕ КАНЦЕРОЛИТИКОВ НА ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ
СПЕКТР ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ
ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ
КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Исследовалось действие циклофосфана и тиофосфамида на изоферментный спектр и общую активность ЛДГ печени мышей. Выявлено, что циклофосфан и тиофосфамид как *in vivo*, так и *in vitro* влияют на опухолевые клетки таким образом, что они теряют способность вызывать изменения в изоферментном спектре ЛДГ.

Ранее нами были исследованы изоферментный спектр и общая активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) тканей мышей и крыс при развитии опухоли [5, 6]. Полученные в экспериментах данные указывали на возможность возникновения нарушений генетической регуляции синтеза ЛДГ печени животных сразу после трансплантации опухолевых клеток. Исследования показали, что наблюдаемые нарушения, по-видимому, характерны лишь для нативных опухолевых клеток. В связи с этим представляло интерес изучение действия противоопухолевых препаратов на наблюдаемый эффект.

Циклофосфан и тиофосфамид—алкилирующие соединения с сильным противоопухолевым действием [2, 7], мутагены, вызывают хромосомные aberrации [4, 8]. Тиофосфамид принадлежит к веществам с фазоспецифическим действием, действует в m и G_1 фазах клеточного цикла. Вызывает образование между двумя цепями ДНК мостиков, препятствующих деспирализации молекулы [3]. Циклофосфан активен во всех фазах клеточного цикла [9], обладает лишь потенциальной алкилирующей активностью, биологический эффект обусловлен действием активных метаболитов, образующихся в результате активации его НАДФ-Н-зависимыми ферментами эндоплазматического ретикулаума печени [1, 10].

Настоящая работа посвящена изучению изоферментного спектра и общей активности ЛДГ печени мышей с клетками асцитной карциномы Эрлиха при действии циклофосфана и тиофосфамида.

Материал и методика

Опыты проводили на белых беспородных мышах массой 20—25 г. Были использованы препараты циклофосфана и тиофосфамида отечест-

венного производства. Животным внутрибрюшинно трансплантировали по 10^7 клеток асцитной карциномы Эрлиха и вводили канцеролитики за 1 час до опухолевых клеток—циклофосфан в дозе 200 и тиофосфамид—15 мг/кг. Растворы канцеролитиков готовили на 0,15 М NaCl. Животных забивали через 12 час после трансплантации опухолевых клеток.

При инкубации опухолевых клеток с канцеролитиками *in vitro* использовали три дозы каждого препарата, рассчитанные на 10^7 клеток: циклофосфан—4, 0,4, 0,04 мг, тиофосфамид—0,3, 0,03, 0,003 мг.

Инкубацию проводили в течение 1 часа при 37° , после чего клетки промывали физиологическим раствором, суспензировали в том же растворе и трансплантировали мышам внутрибрюшинно по 10^7 клеток. Животных забивали через 12 час.

Перевивку опухоли, получение тканевых экстрактов, электрофоретическое разделение изоферментов и определение активности ЛДГ проводили методами, описанными ранее [5]. Степень изменений определяли по величине коэффициентов X и K, рассчитываемых по формулам

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

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 опыте соответственно.

Результаты и их обсуждение

Нашей задачей было выяснить, действуют ли канцеролитики на наблюдаемые при трансплантации опухолевых клеток изменения в изоферментном спектре и общей активности ЛДГ печени.

Таблица 1

Изоферментный спектр ЛДГ при введении канцеролитиков и опухолевых клеток ($M \pm m$)

Серии экспериментов	ЛДГ—1	ЛДГ—2	ЛДГ—3	ЛДГ—4	ЛДГ—5	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
Ц	0	$1,9 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,9$	$23,6 \pm 1,2$	$63,5 \pm 1,6$	12,8
Ц+О	$0,3 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,3$	$14,9 \pm 0,8$	$23,0 \pm 0,5$	$56,5 \pm 1,4$	16,2
Т	$0,6 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,3$	$15,1 \pm 0,9$	$33,4 \pm 1,1$	$47,1 \pm 1,2$	19,4
Т+О	$0,9 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,4$	$13,0 \pm 0,7$	$35,2 \pm 1,5$	$47,4 \pm 1,8$	18,8

Примечание. Н—норма, О—опухолевые клетки, Ц—циклофосфан, Ц+О—циклофосфан и опухолевые клетки, Т—тиофосфамид, Т+О—тиофосфамид и опухолевые клетки.

Нами определялись изоферментный спектр ЛДГ печени мышей при инъекциях циклофосфана и тиофосфамида и действие опухолевых клеток в присутствии этих противоопухолевых препаратов (табл. 1).

Как видно из табл. 1, введение циклофосфана и тиофосфамида приводит к изменению изоферментного спектра ЛДГ печени мышей. Наблюдается значительное уменьшение процентного содержания изофермента ЛДГ-5, несколько уменьшается содержание ЛДГ-1, почти в 3 раза увеличивается содержание гетеротетрамеров. Трансплантация опухолевых клеток через 1 час после циклофосфана еще больше уменьшает содержание ЛДГ-5, увеличивается процентное содержание Н-субъединиц. Однако если нативные опухолевые клетки увеличивают содержание Н-субъединиц до 31,1%, то трансплантированные после циклофосфана клетки увеличивают его до 16,2%. Трансплантация после тиофосфамида опухолевых клеток практически не вызвала никаких изменений.

В контрольных экспериментах было исследовано действие канцеролитиков на опухолевые клетки *in vitro*.

Клетки асцитной карциномы Эрлиха вводили мышам после инкубации с различными дозами циклофосфана и тиофосфамида. Отдельную группу животных оставляли для определения прививаемости опухоли. Трансплантация инкубированных с тиофосфамидом клеток асцитной карциномы Эрлиха не вызвала развития опухоли. Инкубация с циклофосфаном замедляла развитие опухоли. После трансплантации инкубированных опухолевых клеток определяли изоферментный спектр ЛДГ печени (табл. 2).

Таблица 2

Изоферментный спектр ЛДГ после трансплантации инкубированных с канцеролитиками опухолевых клеток ($M \pm m$)

Серии экспериментов	ЛДГ—1	ЛДГ—2	ЛДГ—3	ЛДГ—4	ЛДГ—5	Н, %
А I	0	$1,6 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,3$	$15,9 \pm 0,7$	$78,9 \pm 2,5$	7,0
II	0	$1,9 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,5$	$13,0 \pm 0,6$	$79,0 \pm 2,2$	7,7
III	$1,0 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$	$8,3 \pm 0,4$	$14,8 \pm 0,9$	$73,6 \pm 2,1$	10,6
Б I	0	$1,3 \pm 0,3$	$7,3 \pm 0,5$	$10,4 \pm 0,9$	$81,0 \pm 1,8$	7,2
II	0	$1,5 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,8$	$10,2 \pm 0,8$	$79,4 \pm 1,9$	8,1
III	0	$1,1 \pm 0,1$	$9,4 \pm 0,5$	$11,2 \pm 0,4$	$78,3 \pm 2,3$	8,3

Примечание. А—инкубация с циклофосфаном: I—4, II—0,4, III—0,04 мг/10⁷ кл.; Б—инкубация с тиофосфамидом: I—0,3, II—0,03, III—0,003 мг/10⁷ кл.

Как видно из табл. 2, после инкубации с циклофосфаном и тиофосфамидом опухолевые клетки полностью теряют способность воздействовать на изоферментный спектр ЛДГ печени мышей.

Одновременно с изоферментным спектром ЛДГ определяли и общую активность фермента. Введение канцеролитиков *in vivo* приводило к уменьшению общей активности ЛДГ, опухолевые клетки не увеличивали общую активность ЛДГ печени, что наблюдалось при действии нативных опухолевых клеток. Изменение общей активности ЛДГ при трансплантации инкубированных опухолевых клеток зависит от дозы канцеролитика. На основании полученных данных мы рассчитали ве-

личины изменений, вызываемых канцеролитиками и опухолевыми клетками (табл. 3).

Как видно из табл. 3, канцеролитики практически предотвращают изменения, индуцируемые клетками асцитной карциномы Эрлиха. Если при трансплантации опухолевых клеток через 12 часов коэффициент К увеличивается в 7 раз, то после инъекции канцеролитиков опухолевые клетки увеличивают этот коэффициент в 2 раза. Примерно во столько же раз увеличивается К при введении только тиофосфамида (2,1) и несколько меньше под действием циклофосфана (1,4).

Таблица 3

Действие канцеролитиков на ЛДГ печени мышей и опухолевые клетки *in vivo* и *in vitro*

Вводимые препараты	А, %	Н, %	Х	К
Норма	100	8,0	1,0	1,0
Опухолевые клетки	176	31,1	4,0	7,0
Циклофосфан <i>in vivo</i>	88	12,8	1,6	1,4
Циклофосфан+				
Опухолевые клетки	90	16,2	2,1	1,9
Циклофосфан <i>in vitro</i> 4 мг/10 ⁷ кл.	98	7,0	0,9	0,9
0,4 мг/10 ⁷ кл.	119	7,7	1,0	1,2
0,04 мг/10 ⁷ кл.	122	10,6	1,3	1,6
Тиофосфамид <i>in vivo</i>	84	19,4	2,5	2,1
Тиофосфамид+				
Опухолевые клетки	85	18,8	2,4	2,0
Тиофосфамид <i>in vitro</i>				
0,3 мг/10 ⁷ кл.	106	7,2	0,9	1,0
0,03 мг/10 ⁷ кл.	109	8,1	1,0	1,1
0,003 мг/10 ⁷ кл.	106	8,3	1,1	1,1

Предварительная инкубация опухолевых клеток с этими веществами приводит к полной потере способности клеток вызывать изменения в изоферментном спектре ЛДГ печени мышей. Изменения в изоферментном спектре ЛДГ, увеличение содержания Н-субъединиц и уменьшение общей активности ЛДГ обусловлено действием используемых противоопухолевых препаратов на клетки печени.

Итак, канцеролитики как *in vivo*, так и *in vitro* влияют на опухолевые клетки таким образом, что они теряют способность вызывать изменения в изоферментном спектре и общей активности ЛДГ печени.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступила 6/V 1980 г.

Ա. Վ. ՆՆՐԱՐԱՐՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ԿԱՆՑԵՐՈԼՈՏԻԿՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԿՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԼԱԿՏԱՏ-
ԴԵԶԻԴՐՈՂԵՆԱԶԻ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏՆԱՅԻՆ ԿԱԶՄԻ ՎՐԱ ԷՐԼԻԻՆԻ
ԱՍՑԻՏՆԱՅԻՆ ԿԱՐՑԻՆՈՄԱՅԻ ԲԶԻԶՆԵՐԻ ՆՆՐԱՐԿՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Հետազոտվել է ցիկլոֆոսֆանի և թիոֆոսֆամիդի ազդեցությունը մկանների լյարդի լակտատդեհիդրոգենազի (ԼԴՀ) իզոֆերմենտային կազմի և ընդհանուր ակտիվության վրա: Կանցերոլիտիկները փոքրացնում են ԼԴՀ-ի ընդհանուր ակտիվությունը, փոփոխվում են իզոֆերմենտների քանակական հարաբե-

բակցությունը: Դիտվում է ԼԴՀ—5-ի ակտիվության նվազում և ԼԴՀ—2-ի, ԼԴՀ—3-ի, ԼԴՀ—4-ի ակտիվության զգալի ավելացում:

Ցիկլոֆոսֆանը և թիոֆոսֆամիդը թե *in vivo*, և թե *in vitro* այնպես են ազդում ուռուցքային բջիջների վրա, որ վերջինները կորցնում են ԼԴՀ-ի իզոֆերմենտային կազմում փոփոխություններ առաջացնելու ունակությունը:

A. V. NERKARARIAN, G. H. PANOSYAN

THE EFFECTS OF CYTOSTATICS ON MICE LIVER LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES PATTERN IN INJECTION OF EHRlich ASCITES TUMOR CELLS

It has been investigated the effect of cyclophosphamide and thiophosphamide on mice liver lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes pattern and its total activity. The cytostatics decreased the total activity of LDH and changed the quantity ratio of isoenzymes. It has been observed decrease of activity of LDH-5 and considerable increase of activity of LDH-2, LDH-3 and LDH-4. Cyclophosphamide and thiophosphamide effect on tumor cells both *in vivo* and *in vitro* has caused the lost of ability to cause changes in LDH isoenzymes pattern.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Баркан Р. С., Яковлева Т. К. Генетика, 1979, 15, 5, стр. 862.
2. Волегов А. И., Трофимчук С. М., Зыков Ю. В. Бюлл. exper. биол. мед., 1979, 5, стр. 462.
3. Вольпе П. Биохимия клеточного цикла. М., 1979.
4. Корогодина Ю. В., Гордеева Е. В., Лильп И. Г. Бюл. exper. биол. мед., 1979, 10, стр. 458.
5. Неркарян А. В., Паносян Г. А. Биол. ж. Армении, 1979, 32, 4, стр. 337.
6. Неркарян А. В., Паносян Г. А. Биол. ж. Армении, 1979, 32, 11, стр. 1098.
7. Черноусов А. Д., Фонталин Л. Н., Ксандратъева Т. К. Бюлл. exper. биол. мед., 1979, 5, стр. 449.
8. Lu C. C., Melstrich M. L. Cancer Res., 1979, 39, 9, 3575.
9. Sladek N. E. Cancer Res., 1972, 32, 9, 1848.
10. Ulmer W. Z. Naturforsch., 1979, C31, 9—10, 658.