

С. А. НЕЙФАХ, Н. К. МОНАХОВ, А. Л. ШВАРЦМАН

ИЗОЭНЗИМЫ ГЕКСОКИНАЗЫ В ТКАНЯХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 18 I 1972)

В предыдущих исследованиях нашей лаборатории (¹, ²), выполненных на экспериментальных животных, было установлено, что в опухолевой клетке, где сбраживается только глюкоза, а не гликоген, наименее быстрым ферментом гликолиза, лимитирующим скорость всего цикла реакций, является гексокиназа (АТФ : Д-гексозо-6-фосфотрансфераза, 2.7.1.1) (ГК). Тогда же нами были обнаружены другие весьма существенные отличия свойств опухолевой гексокиназы: более высокое химическое сродство к глюкозе (пониженная величина K_m) и более высокая молярная мощность, чем у нормального прототипа того же фермента (¹). В этих свойствах опухолевой ГК мы нашли объяснение причин агрессивного поглощения раковыми клетками углеводов из нормальных тканей животных (¹). Впоследствии и другие авторы пришли к аналогичному заключению (⁴). В нашей лаборатории Казакова показала, что раковые клетки, постоянно поддерживающие высокий уровень гликолиза, с таким же постоянством способны синтезировать ГК даже в условиях *in vitro* (⁵). Она установила также, что наряду с ГК, содержащейся внутри раковых клеток, существует еще и другая форма фермента, локализующаяся на поверхности клеток, и определяемая в опытах на интактных клетках. Этот тип ГК Казакова назвала «эктоэнзимом», установив тем самым впервые наличие гетерогенности ГК в животных тканях.

Нам не встретились в литературе данные об изоэнзимах ГК в раковых клетках человека. В настоящей работе мы задались целью исследовать структуру изоэнзимного спектра ГК из нормальных тканей и из злокачественных опухолей человека и определить пределы отклонения «раковых» изоэнзимов человека от таковых лабораторных животных. Исследование это тем более казалось интересным, что появление ГК в сыворотке крови человека при раке желудка служит диагностическим признаком этого заболевания (³).

Исследования производили на послеоперационном материала, полученном в клиниках Института онкологии им. Н. Н. Петрова. Непосредственно после операции кусочек удаленной опухолевой или нормальной ткани охлаждали в сосуде Дьюара со льдом и затем отмывали от крови охлажденным раствором 0,25 *M* сахарозы — 0,05 *M* трис-НСl, pH 7,4. Ткань гомогенизировали и гомогенат центрифугировали на ультрацентрифуге Spinco L-2 в течение 2,5 час. при 40 000 об/мин., ротор Ti-50. Содержание белка в растворимой фракции гомогената определяли по методу Лоури (⁷). Активность ГК растворимой фракции измеряли спектрофотометрически (⁸). Диск-электрофорез для исследования изоэнзимного спектра ГК производили в 7,5% полиакриламидном геле в течение 2,5—3 час. при 4° по Дэвису (⁹), градиент потенциала 15—16 в/см. Окрашивание на специфическую гексокиназную активность в геле производили, модифицируя метод Итона (¹⁰). Специфическим контролем окрашивания служило инкубирование геля с раствором, не содержащим АТФ. Окрашенные гели денситометрировали на дифференциальном двухлучевом спектрофотометре

ДСД при длине волны 535 мμ с помощью специальной приставки.

Нумерация изоэнзимов на рис. 1 дается в порядке скорости их движения в электрическом поле. Близко расположенные фракции, наблюдаемые не во всех тканях, обозначены под одним номером буквами *a* и *b*.

Определение активности ГК в растворимой фракции тканевых гомогенатов человека показывает, что ферменты, выделенные из опухолевых тканей, обладают значительно большей активностью, чем ферменты, полученные из гомологичных нормальных тканей. В табл. 1 представлены средние данные исследования послеоперационного материала, получен-

ного от разных людей. Превышение активности «ракового» фермента над нормальным становится еще более наглядным при сравнении малигнизированных и нормальных тканей, полученных от одних и тех же людей. Так, например, в пределах нормальных тканей желудка у больного И-ва активность ГК (в μмол. превращенной глюкозы на 1 мг белка за 20 мин. $\times 10^{-2}$) составила 1,8, в опухолевой ткани 3,5, у больной Ш-вой 2,2 и 2,8 и у больной Э-н 1,1 и 1,8 соответственно.

Наряду с этим мы исследовали также изоэнзимные спектры ГК человека и сопоставили опухолевые ткани и гомологичные нормальные ткани (рис. 1А—Ж). При этом выявлены следующие характерные черты изоэнзимного спектра ГК человека: 1) отличие изоэнзимов нормальных тканей человека от таковых, выявленных ранее у животных ⁽⁶⁾; 2) различие между «раковыми» изоэнзимами человека и животных; 3) уменьшение числа «опухолевых»

* Средние арифметические величины активности гексокиназы; в скобках указано число опытов.

изоэнзимов по сравнению с числом нормальных изоэнзимов и 4) разнообразие «опухолевых» изоэнзимов человека, полученных из разных типов опухолей.

Наши данные показывают, что диск-электрофорез в полиакриламидном геле позволяет выявить в нормальных тканях человека не 4 стандартных типа изоэнзимов, как было получено для нормальных тканей позвоночных животных с помощью крахмального геля ⁽¹¹⁾, или хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе ⁽¹¹⁾, или путем электрофореза на целлюлозных мембранах ⁽⁶⁾, а по крайней мере 5 изоэнзимов для матки человека и 6 изоэнзимов для желудка (рис. 1А, Д). Число изоэнзимов в яичниках человека, по-видимому, еще больше.

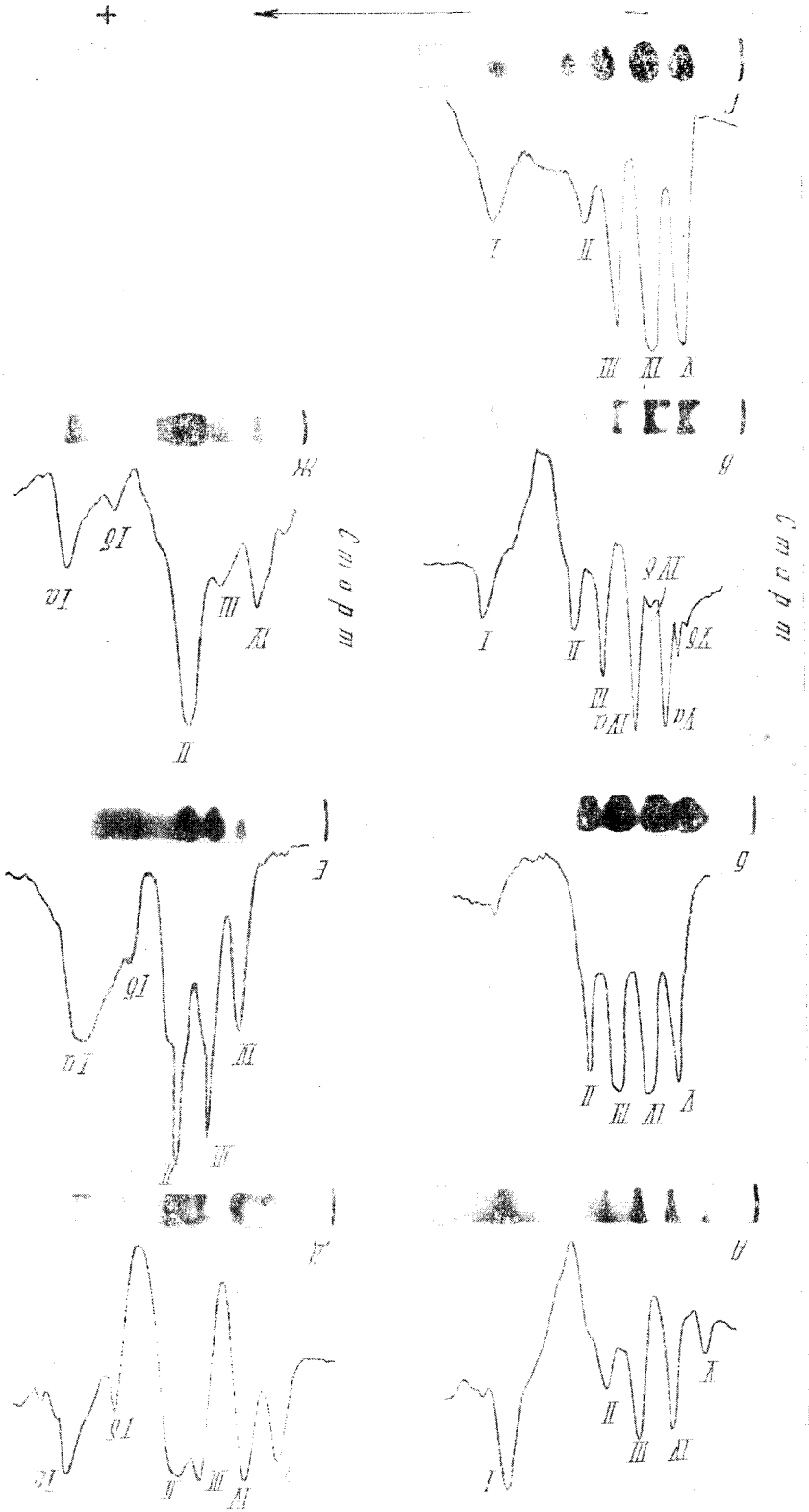
В раковых опухолях человека мы находим 4—6 изоэнзимов, причем некоторые фракции полностью отсутствуют по сравнению с нормой (ср. рис. 1Б с 1А и 1Е с 1Д). Характерно, что в крысиных гепатомах Йошида определено только 2 изоэнзима ⁽⁶⁾, т. е. значительно меньше, чем у человека. Впрочем, мы не можем категорически утверждать, что ГК человека

Таблица 1

Активность гексокиназы
в растворимой фракции гомогената
нормальных тканей и тканей
злокачественных опухолей человека

Объект исследования	Активность гексокиназы* μмол. глюкозы на 1 мг белка за 20 мин. $\times 10^{-2}$
Нормальные ткани	
Желудок	1,68(4)
Матка	1,38(5)
Опухолевые ткани	
Рак желудка	2,66(5)
Рак тела матки	2,67(4)
Рак прямой кишки	3,60(2)
Рак легкого	4,40(4)
Рак яичников	5,20(2)

Рис. 1. Изоэнзимы гексокиназы нормальных и малигнизированных тканей человека. Электрофорез в полиакриламидном геле растворимой фракции тканевого гомогената. Окраска на гексокиназу. Над электрофореграммами приведены данные денситометрии. А — нормальная ткань матки; Б — рак тела матки; В — рак яичника; Г — рак прямой кишки; Д — нормальная ткань желудка; Е — рак желудка; Ж — рак легкого



имеет более сложный изоэнзимный состав, чем таковая животных, так как не исключено, что большее число изоэнзимов, по нашим данным, связано с более высокой разрешающей способностью полиакриламидного геля, по сравнению с другими способами анализа, которыми пользовались авторы, изучавшие ГК животных.

С другой стороны, при сопоставлении полученных нами изоэнзимов ГК из нормальных и из опухолевых тканей человека с применением одного и того же метода мы видим, что ГК злокачественных опухолей человека не составляет исключения из известного правила Гринштейна ⁽¹²⁾, согласно которому опухоли обладают более однообразными и менее варьирующими химическими свойствами, чем соответствующие нормальные ткани. Как видно на рис. 1А, Б и 1Д, Е, опухолевая ГК имеет более упрощенный изоэнзимный спектр по сравнению с нормальной ГК человека. Наконец, нельзя не отметить разнообразие изоэнзимных спектров ГК из различных опухолей человека (рис. 1Б—Г и рис. 1Е, Ж). Хотя в опухолях человека и имеет место биохимическая конвергенция, тем не менее нарушение тканевой дифференциации в каждом типе опухоли протекает по-своему. Исследование изоэнзимного состава может способствовать распознаванию этих специфических особенностей опухолей человека различного происхождения. Исследование изоэнзимов ГК в этом отношении представляет особый интерес, поскольку именно этот фермент определяет общее свойство раковых клеток — высокий уровень гликолиза.

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

Поступило
18 I 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. А. Нейфах, М. П. Фомина, Биохимия, 22, 476 (1957). ² М. П. Мельникова, В кн. Фосфорилирование и функция, Л., 1960, стр. 196. ³ С. А. Нейфах, Н. К. Монахов, Вопр. онкол., 13, № 12, 3 (1967). ⁴ Э. Г. Горожанская, В. С. Шапот, ДАН, 135, 949 (1964). ⁵ Т. Б. Казакова, Биохимия, 23, 620 (1958). ⁶ S. Sato, T. Matsushima, T. Sugimura, Cancer Res., 29, 1437 (1969). ⁷ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). ⁸ Methods of Enzymatic Analysis by H. U. Bergmeyer, 1963. ⁹ B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964). ¹⁰ G. M. Eaton, G. J. Brewer, R. E. Tashian, Nature, 212, 946 (1966). ¹¹ R. T. Schimke, L. Grossbard, Ann. N. Y. Acad. Sci., 151, Art. 1, 332 (1968). ¹² J. P. Greenstein, Cancer Res., 16, 641 (1956).