

УДК 591.3-08 : 615.277.4

ЦИТОЛОГИЯГ. А. БЕЛИЦКИЙ, Т. А. БОГУШ, А. Я. ХЕСИНА,
действительный член АМН СССР Л. М. ШАБАД**СТИМУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА БЕНЗ(А)ПИРЕНА
В КУЛЬТУРАХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ
N⁶, O²-ДИБУТИРИЛ-ЦИКЛИЧЕСКОГО
АДЕНОЗИН-3',5'-МОНОФОСФАТА ИЛИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ**

Клетки, подвергшиеся злокачественному превращению, утрачивают в ходе опухолевой прогрессии ряд свойств, присущих их нормальным предшественникам. В частности, у таких клеток резко снижается способность метаболизировать некоторые чужеродные соединения, например канцерогенные полициклические ароматические углеводороды (^{1, 2}).

В последние годы появились исследования, свидетельствующие о том, что циклический аденозин-3', 5'-монофосфат (цАМФ) может оказывать на некоторые виды опухолевых клеток действие, которое по внешним проявлениям расценивается как нормализующее, фенотипически восстанавливающее дифференцированное состояние (^{3, 4}).

В связи с этим мы сделали попытку восстановить с помощью этого соединения способность трансформированных клеток ряда линий метаболизировать бенз(а)пирен (БП) в культуре ткани.

Эксперименты были поставлены на клетках линий L, 874, 866/1 и 866/2 (^{1, 2}), а также на первичной культуре эмбриональных фибробластоподобных клеток мыши. Как было показано нами ранее, клетки L не метаболизуют БП, а клетки линий 874, 866/1 и 866/2 метаболизуют в различной мере, хотя и значительно медленнее, чем нормальные эмбриональные фибробласты мыши и хомяка. При этом клетки 866/1 метаболизуют БП быстрее, чем 866/2.

Ввиду того что экзогенный цАМФ плохо проникает в клетки, мы, как и приведенные выше авторы, использовали его дибутирильное производное N⁶, O²-дибутирил-циклический АМФ (M₂-АМФ).

Трансформированные клетки высевали по 180·10³ на флакон, нормальные — по 720·10³. Спустя 24 часа меняли среду на свежую, содержащую один из нуклеотидов или жирную кислоту в концентрации 0,1—1,0 ммол/мл. Еще через 20—24 часа в каждый флакон добавляли БП в сыворотке, в концентрации 0,2 мкг/мл (1 мкг на флакон). Спустя 7, 24 или 48 час. после добавления БП, из среды и из клеток экстрагировали остаток канцерогена октаном и измеряли его количество спектрально-флуоресцентным методом (⁵). Одновременно подсчитывали количество клеток во флаконах. На каждую точку брали не менее 3 флаконов.

Проведенные эксперименты показали, что в некоторых линиях опухолевых клеток M₂-цАМФ может значительно усиливать интенсивность метаболизма БП. Так, клетки линии 866/2 в присутствии этого соединения окислили за 48 час. в 4 раза больше БП, чем в контроле (табл. 1). Аналогичный эффект был получен и в культуре нормальных эмбриональных фибробластов. На способность клеток линий L и 874 метаболизировать канцероген M₂-цАМФ влияния не оказывал. Эти данные дают основание полагать, что либо система цАМФ не является необходимым звеном в цепи индукции ферментов свободного окисления, либо таковым является, но экзогенный медиатор не всегда способен вновь восстановить нормальный

ход реакции в опухолевых клетках, которые претерпели дальнейшие изменения в процессе прогрессии. Если последнее соображение справедливо, то клетки линии 866 представляют собой такую разновидность, в которой произошло только первичное не осложненное прогрессией нарушение функций цАМФ, связанных с метаболизмом углеводов.

Таблица 1

Влияние M_2 -цАМФ на способность различных клеточных культур метаболизировать БП

Культура клеток	Длительность инкубации с БП, час.	Остаток БП, % к исходному	
		- M_2 -цАМФ	+ M_2 -цАМФ
Эмбриональные фибробласты мыши	7	77±6,1	46±7,2
L	48	92±4,6	100
L	48	90±2	87±8
874	24	84±8,9	85±8,6
874	48	55±4,1	51±8,1
866/2	48	44±1,1	10±2

Примечание. Концентрация M_2 -цАМФ 1 ммол/мл, БП 0,2 мкг/мл. Перед добавлением БП клетки инкубировали с M_2 -цАМФ 24 часа.

Таблица 2

Метаболизм БП клетками линии 866 в зависимости от условий инкубации и концентрации M_2 -цАМФ

Концентрация M_2 -цАМФ, ммол/мл	Остаток БП, % к исходному *		
	преинкубация с M_2 -цАМФ **		без инкубации *** 866/1
	866/2	866/1	
0	70±8,7	26±2	33±5,8
0,1	35±2,1	3±0,6	38±14,5
0,5	20±6,9	3±1,1	—
1,0	20±9,2	<1	25±2,9

* Исходная концентрация БП 0,2 мкг/мл.

** Спустя 24 часа после рассева клетки инкубировали 24 часа в свежей среде с M_2 -цАМФ или без него, затем еще на 24 часа добавляли БП.

*** Спустя 24 часа после рассева меняли среду на свежую и еще через 24 часа добавляли одновременно M_2 -цАМФ и БП и также инкубировали 24 часа.

В дальнейших экспериментах с линиями 866/1 и 866/2 выяснилось, что обязательным условием стимулирующего действия M_2 -цАМФ (в концентрации 0,1—1,0 мкг/мл) является его предварительная 24-часовая инкубация с этими клетками. При одновременном добавлении в культуру M_2 -цАМФ и БП скорость метаболизма канцерогена, измеренная через 24 часа, не изменялась (табл. 2). Такой характер действия более свойствен обычным индукторам неспецифических оксидаз, нежели цАМФ, эффект которого проявляется в первые часы. В связи с этим были поставлены контрольные эксперименты, в которых наряду с нуклеотидами исследовали эффект масляной кислоты, которая в клетках отщепляется от молекулы M_2 -цАМФ.

Результаты, приведенные в табл. 3, дают основание думать, что влияние M_2 -цАМФ на метаболизм БП в нашем случае могло зависеть от эффекта, вызываемого масляной кислотой. В двух опытах остаток БП в культурах, преинкубированных 24 часа с масляной кислотой и культивированных далее с ней и БП, был в 3 раза меньше контрольного и примерно таким же, как в группе с M_2 -цАМФ. Если активными были бы оба агента — масляная кислота и циклический нуклеотид, — то их суммарный эффект должен был бы превысить эффект каждого, так как маловероятно, чтобы они действовали по одному и тому же механизму.

Относительно жирных кислот известно, что они активно метаболизируются микросомальными оксидазами, которые превращают их в соответствующие оксикислоты (6, 7). Так как субстрат, окисляемый этими ферментами, обычно является индуктором их активности, можно думать, что масляная кислота могла усиливать метаболизм БП просто как один из таких агентов. Эксперимент с двумя другими жирными кислотами — пропионовой и валериановой — отчасти подтвердил это предположение (табл. 4). Из данных табл. 1 видно, что масляная и пропионовая кислоты усиливают окисление БП, в то время как эффект валериановой почти не

выражен. Столь же неактивными оказались в наших дальнейших экспериментах β -оксималяная и γ -аминомасляная кислоты. В связи с этим можно думать, что индуктором ферментной активности в наших опытах была сама масляная кислота, которая оказалась способной усиливать метаболизм БП также и в нормальных эмбриональных фибробластах.

Таблица 3

Метаболизм БП клетками линии 866/1
в присутствии ряда нуклеотидов
и масляной кислоты

Агенты	Остаток БП, % к исходному	
	опыт № 1	опыт № 2
Чистая среда	41±6	68±10,6
М ₂ -цАМФ	22±4	14±8,7
Масляная кислота	12±7,1	22±7,1
цАМФ	34±5,3	81±13,6
АМФ	56±7,9	63±5,8
цГМФ	51±6,4	—

Примечание. Концентрация всех агентов 1 ммол/мл, БП 0,2 мкг/мл. Условия преинкубирования с агентами те же, что и в табл. 2. цГМФ — циклический гуанозин-3',5'-монофосфат.

Таблица 4

Влияние ряда жирных кислот
на интенсивность метаболизма БП
в клетках линии 866/1

Агенты	Остаток БП, % к исходному	
	опыт № 1	опыт № 2
Чистая среда	34±5,1	31±2,6
Пропионовая кислота C ₃ H ₆ O ₂	17±6,6	19±2,9
Масляная кислота C ₄ H ₈ O ₂	11±4	11±2,3
Валериановая кислота C ₅ H ₁₀ O ₂	25±5,6	22±4,2

Примечание. Концентрация жирных кислот 1 ммол/мл, БП — 0,2 мкг/мл. Условия преинкубирования с жирными кислотами те же, что и в табл. 2.

Следует отметить, что масляная кислота, так же как и М₂-цАМФ, резко усиливала способность канцерогена тормозить размножение клеток линий 866/1 и 866/2. Например, если в культурах, инкубированных с БП (1 мкг/мл), через 48 час. обнаруживалось 75% клеток по сравнению с контролем, а в культурах, инкубированных с БП и масляной кислотой или М₂-цАМФ, 55—64%, то при культивировании с БП и масляной кислотой только 18%, а с БП и М₂-цАМФ — в среднем 27%. Этот эффект значительно превышает аддитивный, вычисляемый как произведение составляющих. Такие результаты были получены лишь в том случае, если перед добавлением БП клетки инкубировали с агентами 24 часа. В случае же одновременного добавления БП, М₂-цАМФ или масляной кислоты их токсический эффект только суммировался. Таким образом, усиление метаболизма БП сопровождалось повышением его токсического эффекта, что, по-видимому, объясняется более интенсивным образованием активных метаболитов, которые, как известно, определяют характер биологического действия полициклических ароматических углеводов.

В целом, приведенные нами данные свидетельствуют о том, что с помощью М₂-цАМФ или масляной кислоты можно повысить способность некоторых опухолевых клеток метаболизировать БП, доведя ее почти до нормального уровня. Однако, на наш взгляд, эта «реверсия» не обусловлена восстановлением первичных механизмов, нарушенных в результате опухолевого превращения, а лишь имитируется.

Вопрос о том, является ли система цАМФ обязательным медиатором в цепи индукции ферментов свободного окисления, остается открытым. Недавние эксперименты⁽⁸⁾ показали, что способностью усиливать окисление углеводов в нормальных и опухолевых клетках обладает не только М₂-цАМФ, но также и ингибиторы фосфодиэстеразы — фермента, разрушающего эндогенный цАМФ. Однако эти же авторы наблюдали ряд клеточных линий, не проявивших чувствительности к соединениям, повышающим уровень эндогенного цАМФ. Кроме того в данной работе не исследовали способность масляной кислоты стимулировать метаболизм углеводов.

По-видимому, для решения вопроса необходимы прямые эксперименты, в которых сопоставлялась бы динамика изменения количества эндогенного цАМФ и динамика индукции цитохрома Р-448 (Р-450) в различных клеточных линиях при действии различных агентов.

Институт экспериментальной и
клинической онкологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
17 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. А. Андрианов, Г. А. Белицкий и др., Действие канцерогенных углеводов на клетки, М., «Медицина», 1971. ² С. П. Бакулина, Г. А. Белицкий и др., Вопр. онкол., т. 18, 7, 65 (1972). ³ G. S. Johnson, R. M. Friedman, I. Pastan, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 2, 425 (1971). ⁴ J. R. Sheppard, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 1316 (1971). ⁵ Г. Е. Федосеева, А. Я. Хесина, Журн. прикл. спектроскоп., т. 9, 2, 282 (1968). ⁶ K. C. Robbins, Arch. Biochem. and Biophys., v. 123, 3, 531 (1968). ⁷ A. Y. H. Lu, M. J. Coon, J. Biol. Chem., v. 243, 1331 (1968). ⁸ E. Huberman, H. Yamasaki, L. Sachs, Int. J. Cancer, v. 14, 6, 789 (1974).