

УДК 577.15.041+577.158

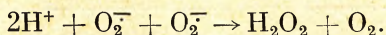
БИОХИМИЯ

А. В. ПЕСКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. А. КОНСТАНТИНОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ

(Представлено академиком Ю. Б. Харитоном 14 IV 1976)

В 1969 году Мак Корд и Фридович ⁽¹⁾ открыли энзиматическую активность широко распространенного белка, известного до того в течение 30 лет под названием «цитокупреин». Было установлено, что этот медь-цинк-содержащий протеид с чрезвычайно высокой эффективностью катализирует реакцию диспропорционирования (дисмутации) радикалов надперекиси водорода (супероксид-радикалов):



Фермент получил название супероксиддисмутазы (СД).

Дальнейшие исследования (см. обзор ⁽²⁾) показали, что высоко токсичные радикалы надперекиси водорода неизбежно образуются в значительных количествах в аэробно живущих организмах, преимущественно в результате «ошибок» (самоокисления) ферментов окислительно-восстановительного обмена клеток, например, ряда флавопротеидов и металлопротеидов. В настоящее время достоверно установлено, что наличие СДазной активности является необходимым условием аэробного существования организмов. Важно отметить, что супероксид-анион O_2^- является основным источником и других еще более токсичных для клетки кислородных радикалов. Таким образом, СД выполняет роль стратегического ключевого фермента, контролирующего уровень «активного кислорода» в клетке и, вероятно, участвует в управлении пока еще недостаточно изученными, но, несомненно, многочисленными нормальными и патологическими процессами, в которые вовлекаются радикалы кислорода.

А. Сент-Дьердьи ⁽³⁾ была выдвинута гипотеза о том, что возникновение контроля над клеточным делением в процессе эволюции было связано с появлением на нашей планете свободного кислорода и что современная клетка при прохождении фазы деления рекапитулирует к своему первобытному анаэробному состоянию (об окислительно-восстановительной регуляции клеточного деления см. также обзор ⁽⁴⁾). Предположения о глубокой зависимости процессов клеточного деления, дифференцировки и старения от уровня кислородных радикалов неоднократно высказывались рядом авторов ⁽⁵⁾. Недавно Пэккером и соавторами ⁽⁶⁾ было показано, что добавление антиоксиданта витамина Е в среду выращивания по меньшей мере удваивает характеристическое число делений, которое проходят клетки культуры фибробластов до ее гибели. При этом наблюдался антагонизм между влиянием увеличения парциального давления кислорода и повышением концентрации токоферола.

Нарушение механизмов контроля над клеточной пролиферацией и дифференцировкой ткани лежит в основе канцерогенеза. Если представления об участии «активного кислорода» в регуляции этих процессов верны, то можно ожидать существенных различий в супероксиддисмутазной активности нормальных и опухолевых тканей. Ацци и соавторы ⁽⁷⁾ недавно сообщили о полном отсутствии супероксиддисмутазы в митохондриях неко-

Условия выращивания опухолей

Вид опухоли	Срок выращивания, недели	Тип выращивания	Животные
Гепатома 27	3-4	Подкожный	Беспородные белые крысы
Асцитная гепатома Зайделя	1	Внутрибрюшинный	То же
Аденокарцинома Уокера 256	2	Подкожный	» »
Аденокарцинома 755	2	»	Мыши С ₅₇ В1♀
Саркома 180	11 дней	»	Беспородные белые мыши
Асцитный рак Эрлиха	1	Внутрибрюшинный	Мыши (С ₅₇ В1♀×СВА♂)♀
Карцинома легкого Льюиса (LLC)	10 дней	»	Мыши С ₅₇ В1♂

Таблица 2

Активность СД в гиалоплазме опухолевых и нормальных тканей

Ткани	Удельная активность СД, ед. на 1 мг белка надосадочной фракции гомогената *	Активность СД, тыс. ед на 1 г ткани	Число измерений **
Крысы			
Печень	105±16	5,70±0,70	7
Гепатома 27	6±1	0,22±0,02	5
Гепатома Зайделя	17±1	0,42±0,01	2
Аденокарцинома Уокера 256	25±6	0,64±0,09	4
Мыши			
Печень	240±50	15,1±3,2	7
Легкие	120±26	4,4±0,2	4
Сердце	67±16	2,4±0,4	3
Селезенка	62±20	3,1±0,1	2
Мозг	91±20	1,9±0,4	2
Асцитный рак Эрлиха	15	0,24	1
Карцинома легкого Льюиса (LLC)	24±4	0,61±0,04	3
Аденокарцинома 775	11	0,50	1
Саркома 180	26±1	0,99±0,04	2

* Определение единицы активности СД см. (8). Даны средние значения ± средняя ошибка указанного числа измерений.

** 1 измерение соответствует определению средней для 1-6 животных активности СД данной ткани в одной экспериментальной серии.

торых опухолей. Нами была исследована СДазная активность в гиалоплазме ряда опухолевых тканей. Условия выращивания опухолей приведены в табл. 1.

Отпрепарированные ткани очищали от некротического материала, измельчали ножницами и гомогенизировали на льду в гомогенизаторе Поттера — Эльвейма (тефлон — стекло) в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 2 мМ ЭДТА и 1 мМ трис-буфер, рН 7,4. В случае гепатомы Зайделя и рака Эрлиха асцитную жидкость отсасывали шприцем и центрифугировали 10 мин. при 800 g. Осажденные клетки гомогенизировали, как описано выше. Гомогенат центрифугировали 60 мин. при 100 000 g для осаждения неразрушенных клеток и клеточных органелл. СДазную активность в надосадочных жидкостях определяли по стандартной методике (8) при 30°. За кинетикой восстановления нитротетразолиевого синего (НТС) следили по увеличению оптической плотности образца при 560 нм с помощью ре-

гистрирующего спектрофотометра «Unicam SP-8000». В условиях наших опытов аэробное восстановление НТС ксантиноксидазой было чувствительно к добавлению СД, выделенной из эритроцитов быка, более чем на 90%. Исследуемые на СДазную активность надосадочные жидкости гомогенатов тканей не обладали заметной НТС-редуктазной активностью и не вызывали окисления восстановленного НТС.

Результаты определения активности супероксиддисмутазы в гиалоплазме опухолевых и нормальных тканей приведены в табл. 2. Можно видеть, что, в отличие от митохондрий (⁷), гиалоплазма опухолевых клеток характеризуется легко измеримой СДазной активностью. Во всех исследованных случаях активность СД практически полностью ингибировалась кипячением, а также добавлением 1 мМ KCN, что указывает на присутствие обычного цитоплазматического изоэнзима СД, содержащего медь и цинк.

При сравнении активности СД в опухолях и в норме возникают трудности, связанные с тем, что гистогенез многих опухолей достоверно не установлен. Можно видеть, что в случае гепатомы-27, гепатомы Зайделя (происходят из клеток печени) и карциномы легкого Льюиса (ведет начало от легочных клеток) уровень СД в гиалоплазме опухолей в 5–17 раз ниже, чем в соответствующих нормальных тканях. В отношении других опухолей можно сказать, что их СДазная активность в несколько раз ниже, чем в любой из исследованных нами тканей. Предварительные эксперименты на регенерирующей печени крысы (через 24, 48 и 120 час. после частичной гепатэктомии) не обнаружили существенных изменений в активности СД этой ткани. Пониженная активность СД не наблюдалась также и в печени крысят на третьи сутки после рождения. По-видимому, низкий уровень СД не является общим свойством интенсивно делящихся тканей, но характерен для опухолей.

Оценка «достаточности» или «недостаточности» активности СД в опухолях для защиты от возникающих эндогенно радикалов кислорода требует, кроме измерения самой активности, знания интенсивности внутриклеточного образования надперекисных радикалов. Показано, что митохондрии некоторых опухолей продуцируют суперокисные радикалы столь же интенсивно, как и митохондрии нормальных тканей (⁷). В отношении цитоплазмы клеток, опухолевых и нормальных, подобные сведения отсутствуют. Известно, однако, что суммарный уровень свободных радикалов специфически снижен в опухолевых тканях (⁹) (но не в регенерирующей печени), причем степень снижения коррелирует со скоростью роста опухоли. В связи с этим нам представляется наиболее вероятным, что низкая активность СД является следствием глубоких перестроек в метаболизме опухолевых тканей, ведущих к уменьшению производства радикалов кислорода их клетками. Так, например, в раковых тканях значительно снижена активность ксантиноксидазы (¹⁰) — фермента, известного своей способностью к энергичному образованию супероксид-анионов (^{1, 2}).

Мы предполагаем, что различия в абсолютных уровнях активности СД в опухолевых и нормальных тканях должны проявляться в большей чувствительности опухолей к искусственному повышению уровня суперокисных радикалов в организме с помощью внешних воздействий. Такими воздействиями могут быть увеличение парциального давления кислорода в дыхательной газовой смеси, γ -облучение, введение химических агентов, стимулирующих внутриклеточную генерацию радикалов O_2^- (имеются указания, что к таким агентам относится ряд противораковых антибиотиков типа адриамицина). Сочетание этих приемов представляется особенно перспективным.

Действительно, медикам известен факт повышения эффективности радиотерапии рака при проведении сеансов облучения в условиях гипероксии (¹¹). Обнаруженная нами низкая активность СД в опухолях, возможно, объясняет это наблюдение. В настоящее время убедительно доказана

уникальная роль СД в механизмах защиты клеток от токсичности кислорода (²). В частности установлено, что образование радикалов O_2^- играет существенную роль в потенцировании кислородом поражающего действия радиации и показано защитное действие СД при γ -облучении микроорганизмов, клеточных культур и экспериментальных животных (см. ссылки в (², ¹²)). Можно думать, что сведения о СДазной активности в опухоли и окружающей ее ткани будут полезны в клинике для оценки перспективности радиотерапии.

После того как материалы этой статьи были подготовлены к публикации, в печати появилось сообщение (¹³), посвященное сравнению активности ряда ферментов окислительно-восстановительного обмена и, в частности, СД в опухоли и норме. В сходных с нашими экспериментальными условиях авторы пришли к прямо противоположному выводу: уровень СД в клетках асцитного рака Эрлиха мышей был выше, чем в печени этих животных. Следует однако заметить, что супероксиддисмутазная активность в печени мыши, измерявшаяся в названной работе (¹³), не превышала долей процента от наблюдавшейся как в наших экспериментах, так и в работах других авторов (¹⁴). В связи с этим обстоятельством заключение о повышенной активности супероксиддисмутазы в опухолях (¹³) не представляется нам достаточно обоснованным.

Авторы глубоко признательны Т. И. Гудзь и А. С. Соболеву за большую помощь в отработке методов измерения супероксиддисмутазной активности. Штаммы ряда опухолей были любезно предоставлены Онкологическим центром АМН СССР.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
19 II 1976

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. M. McCord, I. Fridovich, J. Biol. Chem., v. 244, 6049 (1969). ² I. Fridovich, Ann. Rev. Biochem., v. 44, 147 (1975). ³ A. Scent-Gyorgyi, J. Bioenerg., v. 4, 553 (1973). ⁴ Ю. С. Корзинников, Усп. совр. биол., т. 78, 201 (1974). ⁵ P. Gordon, In: Theoretical Aspects of Aging, N. Y., 1974. ⁶ L. Packer, J. R. Smith, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 71, 4763 (1974). ⁷ O. Dionisi, T. Galeotti et al., Biochim. et biophys. acta, v. 403, 292 (1975). ⁸ C. Beauchamp, I. Fridovich, Anal. Biochem., v. 44, 276 (1971). ⁹ Г. Н. Богданов, В. Н. Варфоломеев и др., ДАН, т. 226, 207 (1976). ¹⁰ N. Prajda, G. Weber, FEBS Letters, v. 59, 245 (1975). ¹¹ A. E. Howes, J. Nat. Canc. Inst., v. 52, 839 (1974). ¹² A. Petkau, K. Kelly et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 67, 1167 (1975). ¹³ В. З. Ланкин, С. М. Гуревич, ДАН, т. 226, 705 (1976). ¹⁴ J. D. Crapo, D. Tierney, Am. J. Physiol., v. 226, 1401 (1974).