



УДК 577.391+616.006

Н. Н. КУЗУБ, Л. А. ЛАСТОВСКАЯ

ВЛИЯНИЕ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ ФОСФОДИЭСТЕРАЗ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ САРКОМЫ 45

Использование гипертермии и гипергликемии в клинической онкологии в качестве эффективных методов сенсбилизации опухолевых клеток к последующим терапевтическим воздействиям требует изучения вероятных механизмов действия этих факторов на экспериментальных моделях. Накопленный к настоящему времени материал онкологических исследований позволяет говорить о важной роли ряда физиологически активных эндогенных соединений в регуляции жизнедеятельности опухолевых клеток [1]. Имеющиеся сообщения о пролиферативной активности циклического 3', 5'-гуанозинмонофосфата (цГМФ), способности циклического 3', 5'-аденозинмонофосфата (цАМФ) стимулировать дифференцировку трансформированных клеток [2], влиянии соотношения циклонуклеотидов на эффективность поглощения клетками гексоз из окружающей среды [3] и транскрипцию генов факторов роста, онкогенов [4] позволяют рассматривать систему метаболизма цАМФ и цГМФ в качестве возможной мишени повреждающего действия физико-химических факторов на клетки опухоли. В данной работе нами проведено исследование термической инактивации двух форм фосфодиэстераз циклических нуклеотидов (3', 5'-циклонуклеотид-3'-гидролаза, КФ 3.4.1.17), выделенных из экспериментальной злокачественной опухоли крыс — саркомы 45.

Материал и методика

Опыты проведены на беспородных белых крысах, содержащихся на стандартном рационе вивария. Перевивка опухолевого штамма саркомы 45 осуществлялась сотрудниками НИИ онкологии и медицинской радиологии МЗ БССР по известной методике [5]. Опухолевый материал получали через 12—15 суток. Отдельные формы фосфодиэстераз (ФДЭ-I и ФДЭ-II) выделяли модифицированным методом [6], включающим стадии гомогенизации исходного материала в четырех объемах буфера (40 ммоль/л трис-ацетат, рН 6,0, 0,5 ммоль/л дитиотреитол), центрифугирования (14 000 мин⁻¹, 20 мин), хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Элюцию отдельных форм ФДЭ осуществляли линейным градиентом концентрации ацетата натрия в диапазоне 0—1,0 моль/л при рН 6,0. Все этапы выделения проводились при температуре не выше 5 °С. Активность фермента определяли при 30 °С по [7].

Инактивация выделенных форм ФДЭ изучалась в экспериментах *in vitro* путем отбора проб через определенные промежутки времени и анализа остаточной активности указанным методом. Константы скорости термоинактивации, энергию активации и термодинамические характеристики процесса рассчитывали по [8].

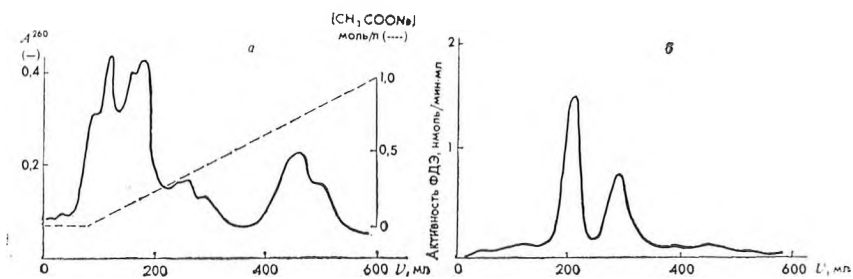


Рис. 1. Хроматография препарата саркомы 45 на ДЭАЭ-целлюлозе. Колонка $2,6 \times 25$ см. Скорость элюции 30 мл/ч:

а — профиль элюции белка; б — профиль активности ФДЭ ($[цАМФ] = 10^{-5}$ моль/л)

Результаты и их обсуждение

Количественный спектр множественных форм ФДЭ в саркоме 45 оценивали по результатам ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (рис. 1). Форма и положение белковых пиков хорошо воспроизводились при повторении процесса разделения на различных партиях опухоли, а проведенный анализ цАМФ-гидролазной активности позволил идентифицировать две различные формы ФДЭ в саркоме 45. Обнаружено, что первая форма фермента (ФДЭ-I) элюируется при концентрации ацетата натрия 0,20—0,25 моль/л, гидролизует цАМФ в диапазоне высоких концентраций, и по кинетическим параметрам может быть отнесена к так называемым фосфодиэстеразам с низким сродством к субстрату (табл. 1). В отличие от нее ФДЭ-II, элюирующаяся с сорбента при концентрации соли 0,30—0,40 моль/л, расщепляет фосфодиэфирную связь цАМФ при его низких концентрациях. Необходимо отметить, что результаты кинетического анализа активности ФДЭ в исходном препарате и отдельных ее форм после хроматографического разделения указывают на аномальную кинетику гидролиза субстрата, выражающуюся в наличии двух пар основных кинетических характеристик. Аналогичные результаты получены авторами работы [6], что может быть связано, по их мнению, с наличием в анализируемом препарате нескольких форм фермента либо с отрицательной кооперативностью по субстрату. Известно, что на основании анализа полученных для ФДЭ кинетических кривых невозможно установить истинное количество субформ фермента [9], поэтому дальнейшая работа проводилась на частично очищенных препаратах ФДЭ. Исследование гидролиза цАМФ выделенной ФДЭ-I показало сохранение нелинейной концентрационной кинетики, что часто наб-

Таблица 1

Кинетические характеристики форм фосфодиэстеразы саркомы 45

Форма фермента	K_M , мкмоль/л	v_{max} , нмоль/мин·мг белка
«Общая» ФДЭ	51	10,7
	225	13,4
ФДЭ-I	147	25,6
	385	30,8
ФДЭ-II	24,5	4,8

Примечания: «общая» ФДЭ — препарат фермента перед нанесением на ДЭАЭ-целлюлозу; ФДЭ-I и ФДЭ-II — формы фермента, выделенные из «общей» ФДЭ путем хроматографии.

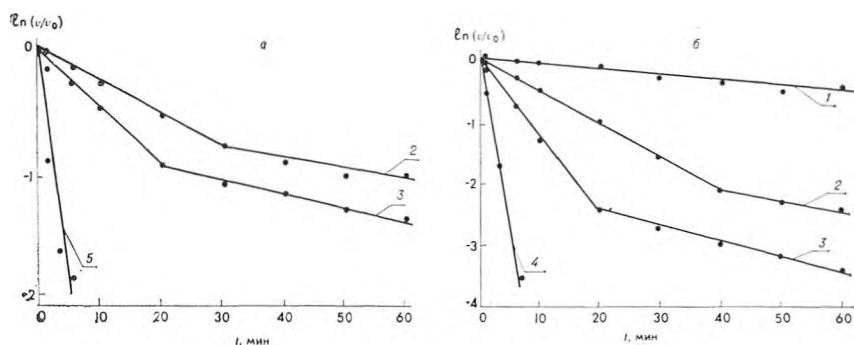


Рис. 2. Термоннактивация ФДЭ-I (а) и ФДЭ-II (б) из саркомы 45 при 30 °С (1), 37 (2), 42,5 (3), 45 (4) и 50 °С (5)

людается на недостаточно очищенных низкоаффинных формах фермента [7]. При этом ФДЭ-II характеризовалась наличием обычной кинетики, что косвенно подтверждает правомерность ее отнесения к высокоаффинным формам ФДЭ [10].

Воздействие гипертермии на организм животных, вызывающее ряд компенсаторных структурно-функциональных изменений в тканях, а также значительное изменение регуляторных и метаболических процессов в клетках [11], может быть отнесено к стрессовым факторам. Поэтому для изучения механизма влияния гипертермии на регуляцию уровня цАМФ в опухоли выбрана модель термоннактивации *in vitro*, которая позволяет вычленить этап прямого воздействия тепла на исследуемые объекты из общей картины ответа организма на данное терапевтическое воздействие (рис. 2).

Наблюдается выраженная зависимость скорости денатурации обеих форм фермента от температуры. Температурный ход полученных констант скорости снижения активности ФДЭ описывается уравнением Аррениуса, что позволило рассчитать термодинамические активационные параметры процесса термоденатурации отдельных форм фермента из саркомы 45 (табл. 2). Необходимо отметить, что полученные значения ΔG , ΔH и ΔS лежат в обычных для денатурации белков пределах. Энергия активации процесса термической инактивации для ФДЭ-I и ФДЭ-II различается в 1,5 раза, а значения ΔG практически одинаковы, что может свидетельствовать об одинаковой лимитирующей стадии процесса инактивации для различных форм фермента. Таким образом, высокие значения энергии активации деструкции активности ФДЭ определяют исключительно высокими положительными величинами энтропийного фактора. Различия ΔS для ФДЭ-I и ФДЭ-II свидетельствуют о неодинаковой степени дезорганизации переходного состояния этих белков в лимитирующих стадиях процесса термоннактивации [8].

Сопоставление температурных зависимостей констант скорости инактивации двух форм ФДЭ из саркомы 45 выявляет равенство скоростей данных процессов при температуре 34 °С. Повышение температуры вызывает более быстрое увеличение скорости денатурации ФДЭ-II, чем

Таблица 2
Кинетические и активационные параметры термоннактивации форм фосфодиэстеразы из саркомы 45

Форма фермента	K, 10 ³ ·с ⁻¹	E _a	кДж/моль		
			ΔG	ΔH	TΔS
ФДЭ-I	1,58	158,0	94,8	156,2	61,4
ФДЭ-II	3,04	242,6	92,4	239,9	147,3

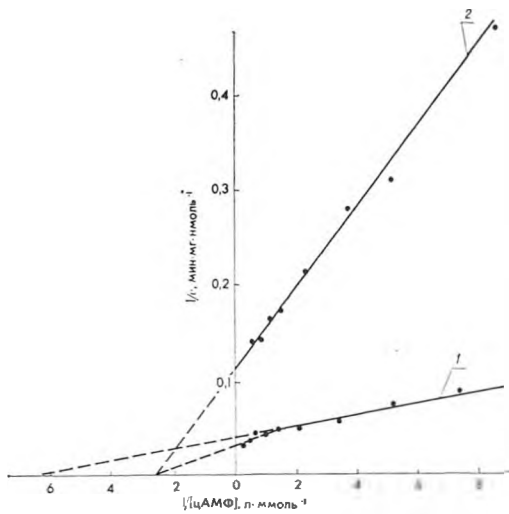


Рис. 3. Изменение кинетических характеристик ФДЭ-I в результате термоинактивации: 1 — исходный препарат; 2 — после термообработки (42,5 °С, 15 мин)

ности скорости гидролиза цАМФ от его концентрации в координатах Лайнуивера — Берка (рис. 3).

Таким образом, при рассмотрении процесса термоинактивации ФДЭ опухолевых клеток и его вклада в изменение баланса циклических нуклеотидов необходимо отметить, что он будет в значительной мере определяться соотношением активности отдельных форм фермента. Обнаруженные различия в термочувствительности выделенных из саркомы 45 двух форм ФДЭ цАМФ в целом хорошо согласуются с существующими представлениями о значительной лабильности высокоаффинной формы фермента в ряде органов и тканей [12]. В результате быстрой инактивации этой формы ФДЭ, составляющей основную часть суммарной циклонуклеотид-гидролазной активности клеток при физиологических концентрациях субстрата (10^{-8} — 10^{-7} моль/л), может происходить снижение скорости деградации цАМФ и, следовательно, возрастание концентрации этого важнейшего регулятора метаболизма клеток животных.

Список литературы

1. Wei J. W., Morris H. P., Hickie R. A. // *Cancer Res.* 1982. V. 42. № 5. P. 2571.
2. Бужуринна И. М., Панов М. А. // *Итоги науки и техники. Общие проблемы физ. хим. биол.* ВИНТИ. 1986. № 3. С. 38.
3. Segal J. // *Am. Journ. Physiol.* 1987. V. 252. № 2. Pt. 1. P. E588.
4. Slungaard A., Conier D. L., Schuback W. H. // *Journ. Clin. Invest.* 1987. V. 79. № 5. P. 1542.
5. Чернов В. А. Методы экспериментальной химиотерапии. М., 1971. С. 357.
6. Turnbull J. L., Hickie R. A. // *Int. Journ. Biochem.* 1984. V. 16. № 1. P. 19.
7. Kakiuchi S., Yamazaki R., Teshima Y., Uenishi K., Miyamoto E. // *Biochem. Journ.* 1975. V. 146. № 1. P. 109.
8. Березин И. В., Клёсов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1976.
9. Cheung W. Y. // *Adv. Cyclic Nucleotide and Protein Phosphoryl. Res.* 1984. V. 16. P. 357.
10. Strada S. J., Martin M. W., Thompson W. J. *Ibid.* P. 13.
11. Браун А. Д., Моженок Т. П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Л., 1987.
12. Bevers M. M., Smits R. A. E., Van Rijn J., Van Wijk R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1974. V. 341. № 1. P. 120.