

Резюме

На прикладі очищення фаголізату клітин *E. coli* від полісахаридів показано можливість електрофоретичного розділення суміші біополімерів, яка складається із компонентів як таких, що несуть електричний заряд, так і електронейтральних.

Ступінь очищення фаголізату від полісахаридів становила більше 73 %.

Summary

The possibility of electrophoretic separation of mixture consisting of electroneutral and charged biopolymers has been shown on the example of purification of phagolysate of *E. coli* cells from polysaccharides.

The degree of purification was more than 73 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pat.* EP N 86302310.7. IC³ G 01 N 27/26. Method and apparatus for separating complex mixtures of bioorganic materials/D. G. Bannerman, W. G. Burton.— Publ. 29.10.86.
2. *Pat.* USA N 4735697. IC³ G 01 N 27»26. Method and apparatus for separating complex mixtures for bioorganic materials/W. G. Burton.— Publ. 05.04.88.
3. Филиппович Ю. Б., Егоров Т. А., Севастьянов Г. А. Практикум по общей биохимии.— М.: Просвещение, 1982.— 311 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 08.02.91

УДК 577.23

А. А. Верхацкая, Е. Л. Прохневская, М. П. Завелевич, Г. Х. Мацука

ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ 2'5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТСИНТЕТАЗЫ В КЛЕТКАХ РАКА ПОЧКИ И МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ, СБРАБОТАННЫХ ИНТЕРФЕРОНОМ

Работа посвящена изучению возможности использования определения активности 2'5'-олигоаденилатсинтеказы как маркера чувствительности клеток к интерферону.

Введение. Интерферон (ИФ) — первый модификатор биологического ответа, который начали применять в онкологической практике. В многочисленных клинических наблюдениях были обнаружены существенные различия в чувствительности опухолей к ИФ [1]. Однако эти закономерности не являются абсолютными и нередко наблюдаются значительные колебания в индивидуальной чувствительности опухолей к разным типам ИФ [2].

Обработка чувствительных к ИФ клеток сопровождается индукцией синтеза в них ряда белков, одним из которых является 2'5'-олигоаденилатсинтеза (2'5'-АС). Индукция последней наиболее закономерно сопутствует антивирусному и антипролиферативному эффектам ИФ. 2'5'-АС в присутствии вирусной или клеточной двуспиральной РНК синтезирует из АТФ серию олигоаденилатов, состоящих из 3—15 адениловых остатков, связанных между собой 2'5'-связью. Олигоаденилат (ОА), образуя комплекс с предсуществующей в клетках неактивной эндонуклеазой, переводит ее в активное состояние. В результате этого эндонуклеаза приобретает способность гидролизовать различные мРНК, что приводит к угнетению белкового синтеза [3]. Это одно из главных звеньев антипролиферативного действия ИФ, но, по-видимому, существуют и другие механизмы [4].

По уровню 2'5'-АС, индуцированной в клетках ИФ, вероятно, можно судить о чувствительности их к ИФ и целесообразности использования определенного типа ИФ в каждом конкретном случае.

© А. А. ВЕРХАЦКАЯ, Е. Л. ПРОХНЕВСКАЯ, М. П. ЗАВЕЛЕВИЧ, Г. Х. МАЦУКА, 1991

В свете изложенного нами было проведено сравнительное изучение уровня активности 2'5'-АС, индуцированной в клетках кратковременных культур карцином почки и мочевого пузыря различными типами рекомбинантного человеческого ИФ.

Материалы и методы. В работе использованы опухоли, удаленные хирургическим путем у больных с диагнозами рака мочевого пузыря и почечно-клеточного рака.

Кусочки опухоли сразу после удаления измельчали механически, помещали в раствор, содержащий ферменты: 0,01 % гиалуронидазы (тип 5, активность 1 500 ед/г), 0,1 % коллагеназы (тип 4, 163—230 ед/г), 0,002 % ДНКазы (тип 1, 100 ед/мг) в среде RPMI-1640. В этом растворе кусочки перемешивали на магнитной мешалке в течение 4—16 ч при комнатной температуре. После такой обработки клеточную суспензию отмывали, фракционировали в ступенчатом градиенте концентрации фиколла/гепака, составленного из 50, 80 и 100 %-ного растворов [5]. Опухолевые клетки, концентрированные в 80 %-ном интервале, собирали и трижды отмывали. Затем клетки в концентрации 500 тыс/мл культивировали в среде ДМЕМ с 15 % сыворотки эмбриона крупного рогатого скота.

В работе использованы три типа человеческого рекомбинантного ИФ: α , β и γ производства Вильнюсского НПО «Фермент». Опытные культуры обрабатывали ИФ в концентрации 1000 ед/мм³ в течение 18—20 ч.

Для определения активности 2'5'-АС клетки после снятия со стекла промывали в буфере, содержащем 10 мМ Нерес, рН 7,6, 10 мМ КСI, 2 мМ Mg(OAc)₂, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, и затем лизировали тем же буфером, но содержащим 0,5 % NP-40. Лизат до определения синтетазы сохраняли в жидком азоте. Перед постановкой реакции клеточный экстракт центрифугировали 10 мин при 10 000 g. В реакции использовали надосадочный цитоплазматический экстракт.

Инкубационная смесь содержала следующие компоненты в общем объеме 50 мкл: 10 мкл клеточного экстракта (10 мг белка в 1 мл), 0,12 М KOAc, 20 мМ Mg(OAc)₂, 20 мМ Нерес/КОН, рН 7,4, 1 мМ дитиотреитол, 0,25 мг/мл креатинкиназы, 10 мМ креатинфосфат, 20 мкг/мл поли (I) · поли (C), 2,5 мМ АТФ, 74 кБк/мл ³H-АТФ.

После инкубации в течение 2 ч при 30 °С пробы прогревали в течение 3 мин при 95 °С и центрифугировали при 1000 g 5 мин. Синтезиро-

Таблица 1

Активность 2'5'-АС в клетках опухоли рака почки *in vitro* до и после обработки различными типами рекомбинантного ИФ

Больные	Базальный уровень	Типы ИФ		
		α	β	γ
1	15	60	50	38
2	27	100	92	59
3	18	54	56	49
4	41	103	98	82
5	53	212	170	127
6	44	158	145	123
7	11	53	46	30
Среднее	30	106	94	74
P	—	<0,01	<0,02	<0,05

Примечание. Активность 2'5'-АС выражена в количестве АТФ, конвертированного в 2'5'-АС (пмоль/ч, 10⁵ клеток). Клетки обрабатывали ИФ в течение 18—24 ч в дозе 1000 ед/мл.

Таблица 2

Активность 2'5'-АС в клетках рака мочевого пузыря *in vitro* до и после обработки различными типами рекомбинантного ИФ

Больные	Базальный уровень	Типы ИФ		
		α	β	γ
1	7	28	56	35
2	20	60	80	40
3	14	84	84	56
4	17	119	136	51
5	53	212	212	159
6	24	120	120	48
7	40	120	80	120
8	33	132	264	66
9	14	84	70	42
Среднее	25	107	122	60
P	—	<0,01	<0,01	<0,05

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1

ванный 2'5'-ОА очищали хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе [6], для чего образцы были разведены до 1 мл в буферном растворе, содержащем 90 мМ КСl, 20 мМ Нерес/КОН, рН 7,4. Образцы дважды пропускали через колонки ДЭАЭ-целлюлозы, уравновешенной тем же буфером. Затем колонки отмывали 40 мл этого буфера и элюировали 2 мл 350 мМ КСl, 20 мМ Нерес/КОН, рН 7,4, и определяли радиоактивность образцов. Активность 2'5'-АС выражали в пмолях АТФ, конвертированного в 2'5'-ОА в течение 1 ч/10⁵ клеток.

Результаты и обсуждение. Определение чувствительности опухолевых клеток к различным типам рекомбинантного человеческого ИФ по изменению уровня активности 2'5'-АС было проведено на опухолевых клетках 16 онкологических больных, из которых у 7 был диагностирован почечно-клеточный рак, а у 9 — рак мочевого пузыря. Все больные были прооперированы, и операционный материал использован для получения краткосрочных культур опухолевых клеток. Результаты изменений активности 2'5'-АС в клетках этих культур до и после обработки их различными типами ИФ представлены в табл. 1 и табл. 2.

Анализируя полученные результаты, прежде всего следует отметить, что средние показатели синтетазной активности в контрольных культурах той и другой группы опухолей (30 пмоль/ч, 10⁵ клеток, для почечно-клеточного рака и 25 пмоль/ч, 10⁵ клеток, для рака мочевого пузыря) довольно близки. Во всех исследованных случаях обработка культур опухолевых клеток любым из трех типов ИФ приводила к повышению активности 2'5'-АС, определяемой в экстрактах из этих клеток, однако степень повышения активности фермента заметно варьировала.

Наиболее значительное увеличение уровня активности синтетазы было отмечено в клетках рака мочевого пузыря (см. табл. 2) при обработке их β-ИФ. Уровень активности синтетазы в этом случае был в среднем более чем в 5 раз выше, чем в контрольных образцах.

Степень увеличения активности синтетазы при почечно-клеточном раке и раке мочевого пузыря при обработке α- и β-ИФ находилась в обратной зависимости от исходного уровня активности фермента.

Так, при почечно-клеточном раке в тех случаях, когда исходный уровень был ниже его среднего значения для всей выборки, средний показатель активности этой подгруппы увеличивался примерно в 4 раза под воздействием α-ИФ и в 3,5 раза под воздействием β-ИФ. В тех же случаях, когда исходный уровень был выше среднего, средний показатель активности фермента для этой подгруппы возрастал для α- и β-ИФ соответственно в 3,3 и 2,7 раза.

Что касается культур клеток рака мочевого пузыря, то такая тенденция была выражена еще больше, и при относительно низких исходных значениях активность синтетазы после обработки α-ИФ выросла более чем в 5 раз, а при обработке β-ИФ — в 6 раз. При более высоких исходных значениях активности 2'5'-АС кратность увеличения была соответственно 3,5 и 3,7. Обработка γ-ИФ ни при низких исходных значениях, ни при высоких не вызывала такого выраженного увеличения активности синтетазы, как другие типы ИФ.

Выше упоминалось, что обработка клеток ИФ любого типа, если это чувствительные клетки (т. е. в них после обработки наблюдается антивирусный или антипролиферативный эффект либо индукция дифференцировочных антигенов), всегда сопровождается индукцией синтеза 2'5'-АС.

В клетках человека в настоящее время описаны четыре различные молекулярные формы 2'5'-АС: с молекулярными массами 40 000, 46 000, 69 000 и 100 000. По крайней мере две из них (40 000 и 46 000), а, возможно, и все четыре считаются с одного гена путем альтернативного сплайсинга. Все четыре молекулярные формы имеют общие антигенные детерминанты. Кроме различий в размерах, эти белки отличаются между собой по своим физико-химическим и функциональным свойствам. При исследовании в различных культурах человеческих клеток было

обнаружено, что многие клетки различаются по набору или количеству соотношению разных молекулярных форм синтетазы и набор синтетаз в данной клетке, вероятно, предопределен характером предшествовавшей дифференцировки.

Методы, используемые в настоящее время для выявления 2'5'-АС, преимущественно биохимические, хотя ряд исследователей уже располагает антисыворотками, а также моноклональными антителами к различным формам синтетазы [7].

Однократная инъекция рекомбинантного ИФ приводит к подъему активности 2'5'-АС в мононуклеарах периферической крови, которые при этом на весь период повышенной активности фермента в клетках приобретают резистентность к инфекции вирусом везикулярного стоматита [8]. В опытах *in vitro* было показано, что в тех случаях, когда ИФ вызывает бласттрансформацию и дифференцировку злокачественных клеток больных хроническим лимфолейкозом, в этих клетках наблюдается подъем активности 2'5'-АС [9]. Правда, авторы этой работы отмечают, что для индукции синтетазы достаточно 1 ч контакта клеток с ИФ, тогда как для бласттрансформации необходим контакт в течение 20 ч. Интересно, что в другой работе те же исследователи [10] показали, что наличие рецепторов к ИФ еще не гарантирует проявления эффектов ИФ в этих клетках, но обнаружение в клетках, обработанных ИФ, 2'5'-АС коррелировало с бласттрансформацией. Эффективная ИФ-терапия больных волосатоклеточным лейкозом сопровождалась подъемом активности 2'5'-АС в лейкоцитах периферической крови [11].

Накопленная к настоящему времени информация, скорее всего, не позволяет утверждать, что 2'5'-АС играет определенную роль в противоопухолевом эффекте ИФ. Однако существование упомянутой выше корреляции между индукцией 2'5'-АС и эффектами ИФ дает возможность предположить, что обнаружение в клетках, обработанных ИФ, синтетазы должно указывать на чувствительность их к ИФ. Такое определение чувствительности к ИФ позволит не только решить вопрос о целесообразности использования ИФ в данном случае, но и контролировать в динамике режим введения препарата.

Полученные нами данные указывают на то, что такой тест может быть применен также для выбора типа ИФ, наиболее подходящего для каждого конкретного случая. Так, например, если судить по уровню индукции 2'5'-АС при раке мочевого пузыря, наиболее эффективным должен оказаться β -ИФ, однако такие выводы требуют дополнительных клинических наблюдений. Сравнительно слабый ответ на γ -ИФ, естественно, оставляет открытым вопрос об использовании его в качестве иммуномодулятора.

Из результатов настоящей работы можно сделать вывод о том, что обработка клеток кратковременных культур почечно-клеточного рака и рака мочевого пузыря различными типами человеческого рекомбинантного ИФ приводит к повышению активности 2'5'-АС. В клетках почечно-клеточного рака наиболее эффективным оказался α -ИФ, а в клетках рака мочевого пузыря — β -ИФ.

Резюме

Обробка клітин первинних культур раку нирки та сечового міхура препаратами інтерферонів α , β чи γ людини призводила до підвищення рівня активності 2'5'-олігоаденілатсинтетази в цих клітинах. Найбільш ефективними в цьому відношенні були інтерферон α для клітин раку нирки та інтерферон β для клітин раку сечового міхура.

Summary

The article deals with the investigation aimed to use the 2'5'-oligoadenylate synthetase activity as the marker of interferon-sensitivity of some cells.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Strander H.* Interferon treatment of human neoplasia // *Adv. Cancer Res.*—1986.—**1**.—P. 265.
2. *Balkwill F. S., Griffin D., Lee A. E.* Interferons α and γ differ in their ability to cause tumour stasis and regression *in vivo* // *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*—1989.—**25**, N 10.—P. 1481—1486.
3. *Interferon* action: two distinct pathways for inhibition of protein synthesis by double stranded RNA / *P. S. Farrell, G. C. Sen, M. F. Dubois et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1978.—**75**.—P. 5893—5897.
4. *Kortsaris A.* 2'—5' oligo(A) synthetase levels in interferon-sensitive or resistant breast cancer cells // *Microbiology.*—1988.—**11**.—P. 111—117.
5. *Tsu-Yi Chao, T. Ming Chu.* Effect of indomethacin on tumor-infiltrating lymphocytes of a spontaneously developed murine mammary adenocarcinoma // *Cancer, Immunol., Immunother.*—1989.—**30**.—P. 158—164.
6. *Synthesis of 2'5'-oligo(A)* in extracts of interferon-treated *HeLa* cells / *M. A. Minks, S. Benvenin, P. A. Maroney, C. Baglioni* // *J. Biol. Chem.*—1979.—**254**.—P. 5058—5064.
7. *Identification of 69 kd and 100 kd forms of 2-5A synthetase in interferon-treated human cells by specific monoclonal antibodies* / *A. G. Hovanessian, A. G. Laurent, S. Chebath et al.* // *EMBO J.*—1987.—**6**, N 5.—P. 1273—1280.
8. *The time course of interferon levels, antiviral state, 2',5'-oligoadenylate synthetase and side effects in healthy man* / *F. M. Barouki, F. R. Wiffier, D. E. Griffin et al.* // *J. Interferon Res.*—1987.—**7**, N 1.—P. 29—39.
9. *Östlund L., Einhorn S., Robert K.-H.* Induction of 2',5'-oligoadenylate synthetase and blast transformation in primary chronic lymphocytic leukemia cells following exposure to interferon *in vitro* // *Cancer Res.*—1986.—**46**.—P. 2160—2163.
10. *α -Interferon receptors in malignant B-cells from patients with chronic lymphocytic leukemia: relation to induction of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and blast transformation* / *L. Östlund, D. Grauder, G. Juliusson et al.* // *Ibid.*—1989.—**49**.—P. 3425—30.
11. *Different antitumor mechanisms of interferon-alpha in the treatment of hairy cell leukemia and renal cell cancer* / *F. Porzolt, W. Digel, H. Jacobsen et al.* // *Cancer.*—1988.—**61**.—P. 288—293.

Иң-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 07.03.91