



УДК 577.391+616.006

Н. М. ОРЕЛ, А. Т. ПИКУЛЕВ, Н. М. ГРЕЦКАЯ

ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ СВЧ ГИПЕРТЕРМИИ НА АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ САРКОМЫ 45

В последние годы возрос интерес онкологов к использованию гипертермии и особенно управляемой СВЧ гипертермии при лечении злокачественных новообразований. Результаты исследований свидетельствуют о том, что прогревание опухолевой ткани в диапазоне температур 42—44 °С повышает проницаемость мембран, нарушает синтез ДНК и белка, вызывает некроз клеток опухоли [1—3]. Отмечено, что локальная гипертермия приводит к ацидозу в опухоли за счет снижения потребления O_2 и увеличения анаэробного метаболизма, при котором главным образом аккумулируется лактат и другие продукты [4, 5]. Это не может не отразиться на физико-химических параметрах крови. Так, установлено, что через 24 ч после прогревания в ней возрастает уровень глюкозы, изменяется содержание ряда ферментов [6]. С целью расширения наших представлений о состоянии организма при термотерапии в этой работе представлены результаты исследований общей активности лактатдегидрогеназы (КФ, 1.1.1.27, ЛДГ) и ее изоферментов, имеющих важное диагностическое значение, в сыворотке крови крыс-опухоленосителей после локальной СВЧ гипертермии саркомы 45.

Материал и методика

Опыты проведены на нелинейных белых крысах-самцах массой 150—180 г. Опухолевый штамм саркомы 45 прививали подкожно в паховую область по методу В. А. Чернова [7]. Животных использовали в опыте на 12—13-е сут развития опухоли.

Локальную СВЧ гипертермию проводили на установке «Парус» с частотой электромагнитного излучения 2450 МГц (λ 12,6 см). Антенны-излучатели диаметром 5 см устанавливали над опухолью. Температуру измеряли с помощью медь-константановых термопар, которые вводили перпендикулярно к вектору E поля. Температурно-экспозиционный режим составлял 42 °С (нижний полюс опухоли) в течение 30 мин, погрешность измерения $\pm 0,1$ °С.

Гипертермию осуществляли на фоне нейролептоанальгезии, вызванной внутримышечным введением смеси дроперидола и фентанила (2 : 1) по 0,3 мл/100 г массы животного.

Исследования проводили через 6, 18, 24, 48 и 120 ч после сеанса. В каждой серии использовали 6—7 крыс. Контролем служили «интактные» опухоленосители.

Общую активность ЛДГ определяли спектрофотометрически по методу [8]. Активность изоферментов рассчитывали, исходя из общей, после проведения диск-электрофореза в полиакриламидном геле и денситометрии. Расчет соотношения Н:М форм проводили математическим методом [9]. Белок определяли по [10]. Данные обработаны методом биологической статистики, описанным П. Ф. Рокицким [11].

Результаты и их обсуждение

Развитие саркомы 45 повышает общую активность ЛДГ и приводит к достоверному снижению ЛДГ-1 и увеличению ЛДГ-2 и ЛДГ-4 изоферментов. Такие изменения являются характерными и согласуются с данными [12], которые указывают на увеличение общей активности ЛДГ в сыворотке крови больных раком. Они, в какой-то мере, могут быть обусловлены увеличением доли заключительной реакции гликолиза в реализации потребления опухолью глюкозы [13].

Как вытекает из результатов исследований, через 6 ч после воздействия СВЧ гипертермии общая активность ЛДГ в сыворотке крови имеет незначительную тенденцию к повышению. В более поздние сроки происходит понижение скорости дегидрирования лактата ферментом. Наиболее значимые сдвиги отмечены через 18, 48 и 120 ч. Изменения в изоферментном спектре характеризуются увеличением активности ЛДГ-3 в первый исследованный срок. Через 18 ч отмечается повышение ЛДГ-1 при снижении ЛДГ-2 и ЛДГ-4 изоферментов. Через 24 ч после сеанса прогревания увеличивается скорость реакции, катализируемой ЛДГ-1 и ЛДГ-5 изоферментами, и уменьшается — промежуточными, особенно ЛДГ-3 и ЛДГ-4. К исходу 2-х и 5-х сут направленность изменений в изоферментном спектре в сторону активации ЛДГ-1 и ЛДГ-5 и угнетения промежуточных изоферментов сохраняется. Количественно сдвиги более выражены через 48 ч после воздействия.

Расчет соотношения Н:М форм изоферментов свидетельствует о том, что через 18 ч после прогревания в сыворотке крови возрастает доля Н форм изоферментов и снижается доля М форм. В более поздние сроки из-за противоположной направленности сдвигов активности анодного, катодного и промежуточных изоферментов соотношение Н:М форм близко к уровню его у контрольных животных.

Из данных литературы [14] известно, что повреждение внутриклеточных и цитоплазматических мембран, отек, а затем деструкция раковых клеток после локальной гипертермии наступает к концу 1-х сут, и содержащееся в клетках частично поступает в кровоток. В течение последующих 2—3-х сут деструктивные изменения нарастают. Увеличение активности анаэробного изофермента в сыворотке крови в эти сроки может быть связано с поступлением его из саркомы 45, в которой на 12—13-е сут ее развития он определяет общую активность фермента [15]. Однако существенное повышение активности ЛДГ-1 и снижение ее у промежуточных изоферментов не может быть объяснено только с позиции «высвобождения», так как, возможно, является ответной реакцией организма на патохимические вещества, образующиеся в саркоме 45 после применяемого воздействия [14]. Тем не менее сопоставление результатов наших исследований и данных литературы дает основание сделать заключение о том, что специфические изменения общей активности ЛДГ и ее изоферментного спектра, наступающие в сыворотке крови через 24—120 ч после локальной СВЧ гипертермии, позволяют косвенно оценивать состояние регрессивных процессов в опухоли.

Список литературы

1. Dreznik A., Falk R., Howard E., Makovka L., Venturi D. // *Canad. J. Surg.* 1982. V. 26. P. 603.
2. Storm F., Elliot R., Harrison W., Morton D. // *IEEE. Trans Microwave Theor. Techn.* 1982. V. 30. № 8. P. 1149.
3. Волков Е. П., Полежаев А. А. // *Успехи соврем. биологии.* 1983. Т. 96. В. 3. (6). С. 353.
4. Лопатин В. Ф., Деденков А. Н. // *Мед. радиология.* 1979. № 9. С. 9.
5. Александров Н. Н., Савченко Н. Е., Фрадкин С. З., Жаврид Э. А. *Применение гипертермии и гипергликемии при лечении злокачественных опухолей.* М., 1980.
6. Vaupel P., Müller-Kleiser W., Otte J., Mans R., Kallinowski F. // *Strahlentherapie.* 1983. B. 159. H. 2. S. 73.
7. Чернов В. А. *Методы экспериментальной терапии.* М., 1971.

8. Schwert G., Winer A. // Acad. Press. 1963. P. 127.
9. Даниелян К. С., Акопян Ж. И. // Биолог. ж. Армении. 1979. Т. 32. № 4. С. 330.
10. Lowri O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265.
11. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1964.
12. Горожанская Э. Г., Шапот В. С. // Вопр. онкологии. 1980. Т. 24. № 1. С. 55.
13. Протасова Т. Н. Гормональная регуляция активности ферментов. М., 1975.
14. Александров Н. Н., Фурманчук А. В. // Вопр. онкологии. 1982. Т. 28. № 4. С. 89.
15. Кукулянская М. Ф., Мохорева С. И., Орел Н. М. и др. Применение гипертермии и гипергликемии в лечении злокачественных новообразований: Материалы совещ. Координац. совета всесоюз. межведомств. программы «Модификатор». Минск, 1983. С. 106.

УДК 612.111.7:535.37

А. Б. САМАЛЬ, С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ, Н. Ф. ХМАРА

СВЯЗЫВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА 1-АНИЛИНОНАФТАЛИН-8-СУЛЬФОНАТА ТРОМБОЦИТАМИ

Для оценки изменений в мембранных системах клеток при действии на них физических и химических факторов широко используется флуоресцентный зонд АНС [1]. С применением АНС исследуется влияние агрегирующих агентов на структурные и функциональные свойства тромбоцитов [2, 3]. Данные о механизмах взаимодействия тромбоцитов с АНС в литературе отсутствуют. С целью правильной интерпретации результатов, получаемых с применением флуоресцентного зонда АНС, в работе проведено изучение взаимодействия этого зонда с тромбоцитами в условиях варьирования рН среды и концентрации ионов кальция.

Материал и методика

Отмытые тромбоциты получали из крови доноров методом дифференциального центрифугирования [4] и суспендировали в буфере, содержащем ЭДТА. В качестве буферов использовали универсальную буферную смесь или трис-НСl. При исследовании люминесценции 0,05 мл суспензии тромбоцитов добавляли к 2 мл забуференного 0,155 М NaCl. Концентрация тромбоцитов в исследуемых суспензиях составляла 1—5·10⁶ клеток в мл раствора, концентрация АНС (Serva, ФРГ) 10⁻⁴—10⁻⁵М. Спектры флуоресценции исследовали с помощью установки, описанной в работе [5].

Параметры связывания зонда АНС тромбоцитами определяли путем флуориметрического титрования [6]. Флуоресценцию АНС возбуждали светом с длиной волны 360 нм, регистрировали при 480 нм.

Определение проницаемости мембран тромбоцитов к АНС проводили, как описано в работе [1]. Согласно методике, к суспензии тромбоцитов добавляли АНС и регистрировали кинетику изменения интенсивности флуоресценции этого зонда. После установления равновесия тромбоциты осаждали центрифугированием в течение 2—3 мин при 400 g, осадок доводили до прежнего объема 0,155 М NaCl и вновь регистрировали кинетику изменения флуоресценции АНС.

Результаты и их обсуждение

Исследование спектров люминесценции АНС показало, что при взаимодействии с тромбоцитами интенсивность флуоресценции зонда резко увеличивалась, а максимум в спектре его флуоресценции смещался от 520 до 480 нм, т. е. АНС при связывании с тромбоцитами попадал в неполярное окружение. Кинетика изменения интенсивности флуоресценции АНС после его добавления к тромбоцитам зависела от рН среды. Как видно на рис. 1, в средах со значениями рН, меньшими 7,0, сразу же после добавления АНС к клеткам происходит быстрое увеличение интенсивности флуоресценции до некоторой постоянной величины (кривая 2). При добавлении АНС к тромбоцитам, суспендированным в сре-