EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED. XV KÖIDE
BIOLOOGILINE SEERIA. 1966, Nr. 4

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ТОМ XV
СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ. 1966, № 4

https://doi.org/10.3176/biol.1966.4.16

E. ROSE

SARKOOM 45 HEKSOKINAASI AKTIIVSUSEST JA SELLE MÕJUTATAVUSEST SARKOLÜSIINRAVIGA

Keemiliste ainete hulgas, mida kasutatakse vähi ravimiseks, moodustavad tähtsa grupi nn. alküülivad ühendid. Nendest on sarkolüsiin leidnud kliinilises ja eksperimentaalses onkoloogias laialdast kasutamist.

Sarkolüsiin (p-di(2-klooretüül)amiin-d, l-fenüülalaniinkloorhüdraat) sünteesiti 1953. aastal samaaegselt Moskvas ja Londonis (Ларионов, 1962), kusjuures selgus kohe, et ta avaldab ravivat toimet mõnedesse kasvaja liikidesse. Nõukogude Liidu farmatseutiline tööstus hakkas sarkolüsiini tootma 1956. aastal.

Sarkolüsiini ja teiste alküülivate preparaatide toimet nii normaal- kui ka kasvajakudede fermendisüsteemidesse on vähe uuritud. M. Dixon (Bellelli, 1961) uuris 1941. aastal ipriidi pidurdavat mõju fermentidesse ja leidis, et ipriiditundlikeks osutusid fosfokinaasid, nende hulgas heksokinaas. Dixoni arvates baseerubki ipriidi toksilisus fermendi heksokinaasi mürgitamisel. Lämmastikipriidid vähendavad eeskätt glükoosi utilisatsiooni kasvajas. L. Bellelli (1961) järgi pärsib sarkolüsiin heksokinaasi aktiivsust nii normaalsetes kui ka Ehrlichi astsiitkasvaja rakkudes.

Kasvaja ainevahetuse üheks iseärasuseks peetakse kõrgenenud anaeroobse ja aeroobse glükolüüsi võimet (Warburg, 1923, 1956). Sellest lähtudes on püütud pidurdada kasvaja arenemist glükolüüsi pärssimisega. Nimelt hävib kasvajarakk O. Warburgi teooria järgi glükolüüsi täieliku pärssimisega. See seisukoht on üldiselt aktsepteeritud (Griffin, 1960).

Glükolüüsi intensiivsus sõltub tema kõige «aeglasema» lüli, fermendi heksokinaasi aktiivsuse astmest kasvajakoes (Нейфах, Фомина, 1957; Kiesow jt., 1960; Eltzina, Heise, 1965). D. Burk (1957) pidas vähiraku kõrgenenud glükolüüsi põhjuseks heksokinaasi aktiivsuse tõusu ja püüdis alküülivate preparaatide kemoterapeutilisi efekte põhjendada heksokinaasi aktiivsuse pidurdamisega, kuigi mõnede autorite, näit. E. Boylandi jt. (1951) varasematel andmetel kasvajavastased preparaadid ei mõjustanud heksokinaasi aktiivsust. Ka H. Schlief ja C. G. Schmidt (1955) ei leidnud seost hiire astsiitkartsinoomi heksokinaasi aktiivsuse ja kasvu kiiruse vahel. Võrreldes kasvajate glükolüüsi ja heksokinaasi aktiivsuse tasemeid, tulid need autorid järeldusele, et heksokinaasi esineb kasvajarakkudes üleliia ning et glükolüütiliste fermentide aktiivsus ei saa limiteerida kasvajarakkude süsivesikute ainevahetust. G. Sydow (1964) näitas, et nii normaalsete kui ka kasvajarakkude heksokinaasisisaldus on kaugelt kõrgem, kui see väljendub nende glükolüüsi suuruses.

On üldiselt teada, et kasvaja arenemine kulgeb kiiremate ja aeglasemate kasvuperioodide vaheldumisega, millega peaksid kaasnema fermentide aktiivsuse muutused. Tavaliselt ei pööra autorid sellele küsimusele

küllaldast tähelepanu, mispärast meie arvates pole paljude uurijate poolt registreeritud nihked kasvaja ainevahetuses omavahel võrreldavad.

Kõigest ülaltoodust lähtudes pakkus huvi jälgida, kas sarkoom 45 heksokinaasi aktiivsus muutub eri arenemisetappidel ja kas heksokinaasi aktiivsus muutub seoses sarkoom 45 arenemise pidurdumisega sarkolüsiini toimel.

Metoodika

Katsed viidi läbi 1965. a. maikuus 40 valgel emasel rotil. Sarkoom 45 saadi NSV Liidu Meditsiiniteaduste Akadeemia Eksperimentaalse ja Kliinilise Onkoloogia Instituudi tüvede laboratooriumist. Kasvaja pookematerjaliks võeti 10-päevased sarkoomid, millest valmistati homogenaat. See suspendeeriti füsioloogilise lahusega vahekorras 1:3 ja süstiti annuses 0,3 ml kõikidele katseloomadele parema külje naha alla. Katseid alustati 12. päeval peale pookimist, kui kasvaja keskmine läbimõõt nii kontroll- (19 looma) kui ka katsegrupis (21 looma) oli 3 cm.

Katseloomadele süstiti iga päev sarkolüsiini intraperitoneaalselt annuses 2 mg/kg, kontroll-loomadele aga sama kogus füsioloogilist lahust. *In vitro* oli lisandatud sarkolüsiini lõppkontsentratsiooniks 10^{-4}. Kõiki loomi kaaluti iga 3—4 päeva järel ja määrati kasvaja läbimõõt. Loomad surmati dekapiteerimisega. Kasvaja peenestati homogenisaatoris ZMA-1964 (3000 p/min 5 min vältel) ja kasvaja valgud ekstraheeriti loksutusaparaadil 30 min vältel jääkülma 0,03M KCl-lahusega. Lahustamata koeosad eraldati tsentrifuugimisega (1000 p/min 10 min vältel). Sarkoom 45 heksokinaasi aktiivsuse määramiseks võeti 0,5 ml 2,5%-list ekstrakti, mis vastab 12,5 mg-le kasvaja kaalule. Inkubatsioonisegu inkredientide lõppmolaarsused olid järgmised: glükoos — 0,0012M, ATP — 0,005M, $MgCl_2$ — 0,005M, KF — 0,05M, kaaliumfosfaatpuhver (pH 7,8) — 0,04M, KCl 0,042M (Long, 1952). Nimetatud ainetest esimesed kolm sisaldusid lahuses, mis valmistati katsepäeval *ex tempore*; teised sisaldusid külmutuskapis säilitatavas lahuses. Kumbagi lahust võeti igaks prooviks 0,25 ml. Üldine inkubatsioonisegu maht oli 1,0 ml.

Inkubatsiooni (30 min vältel 37° C temperatuuris) alustati kasvajaekstrakti lisamisega ingredientide segule ja lõpetati 2,0 ml $CdSO_4$ lisamisega. Glükoosi hulk määrati Hagedorni-Jennseni järgi (Петрунькина, 1961). Kasvajaekstrakti valgu lämmastikusisaldus määrati Kovarski meetodil (Петрунькина, 1961).

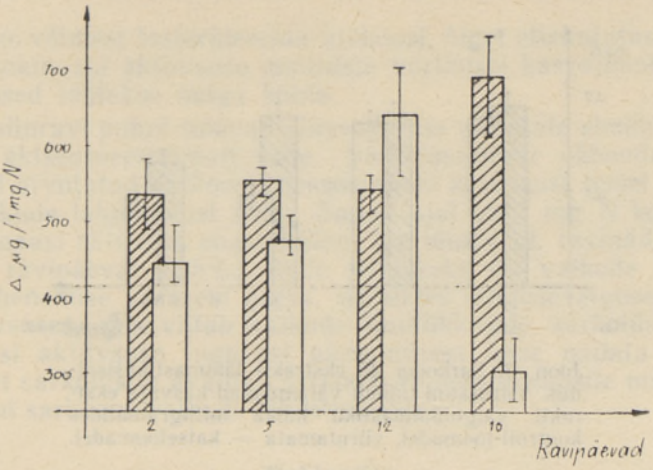
Heksokinaasi aktiivsust hinnati kahel erineval viisil: 1) glükoosi hulga vähenemise alusel lähtekoe konstantse hulga (12,5 mg) kohta ja 2) glükoosi hulga vähenemise alusel kasvajaekstrakti valgu 1 mg lämmastiku kohta.

Sarkoomi kasvu pidurduse protsent (p%) arvutati R. A. Schreki (1935) üldtuntud valemi järgi.

Katsetulemused kontrolliti variatsioonstatistiliselt, kusjuures kasutati Studenti *t*-testi ja Spearmani rangkorrelatsioonikoefitsienti (Фишер, 1958; Каминский, 1964).

Katsetulemused

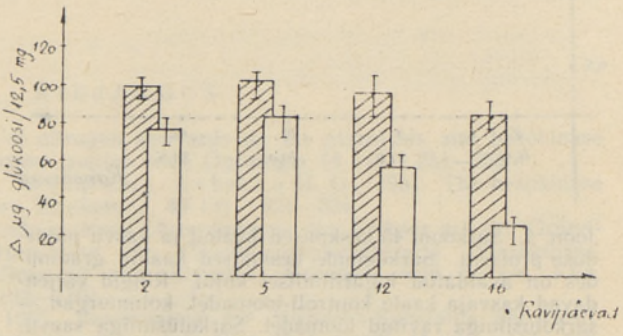
Kontroll-loomade kasvajate heksokinaasi (vt. joon. 1) aktiivsus 1 mg N kohta oli esimesel katsepäeval 535 ± 43,8. Kaks nädalat hiljem tõusis see 28% (686 ± 64,4; $P_{dif} < 0{,}01$). Kasvaja ainevahetuse dünaamika jälgimisel glükoosi kao alusel 12,5 mg lähtekoe kohta tuli ilmsiks vastupidine resultaat, s. o. glükoosi kao vähenemine seoses kasvaja vananemisega. Teise nädala lõpuks vähenes see 12% (99 ± 24 katse algul ja 87 ± 6 katse lõpul; $P_{dif} < 0{,}02$). Seejuures olid fermendi aktiivsuse muutused märksa konstantsemad. Kahe erineva moodusega arvutatud heksokinaasi aktiivsuse analüüs näitas, et fermendi aktiivsuse (arvutatud 1 mg N kohta) tõusu põhjuseks on sarkoomi lahustuva valgu hulga vähenemine (joon. 3).



Joon. 1. Sarkoom 45 heksokinaasi aktiivsuse dünaamika. Heksokinaasi aktiivsus on väljendatud glükoosi hulga vähenemise põhjal mikrogrammides 1 mg valgulämmastiku kohta. Viirutatud tulbad väljendavad fermendi aktiivsust kontroll-loomade sarkoomides, viirutamata — sarkolüsiinravi puhul.

Nimelt teise nädala lõpuks on kasvajate valkude lahustuvus langenud 31,5% (0,19 ± 0,01 mg N katse algul ja 0,13 ± 0,01 mg N katse lõpul; $P_{dif} < 0{,}001$).

Võrreldes sarkoomi heksokinaasi aktiivsuse tõusu tema kasvu kiirusega nähtub (vt. joon. 4), et seos kasvaja kaalu ja heksokinaasi aktiivsuse vahel on mõõdukas (Spearmani rangkorrelatsiooni alusel $\varrho = 0{,}41$). Sarkoomi ekstrakti heksokinaasi aktiivsus aga, arvutatud lähtekoe alusel, näitas tihedat seost ($\varrho = 0{,}55$): koos kasvaja valgu lahustuvuse langusega väheneb ka sarkoomi glükoosi utilisatsiooni võime.

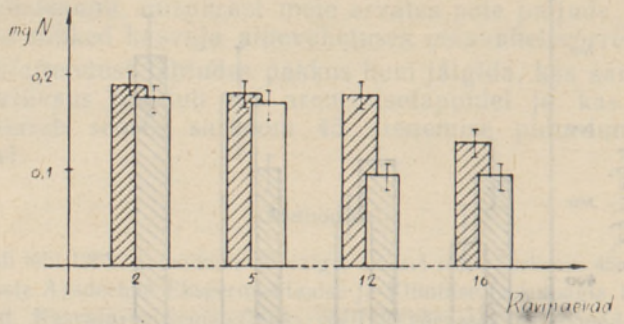


Joon. 2. Sarkoom 45 heksokinaasi aktiivsus, arvutatud lähtekoe kaalu kohta. Viirutatud tulbad väljendavad glükoosi hulga vähenemist mikrogrammides sarkoomi ekstraktis, viirutamata — sarkolüsiinravi puhul.

Sarkolüsiinravi avaldas meie katsetes sarkoom 45 kasvule kindlat pidurdavat toimet (joon. 4), mis avaldus juba esimestel katsepäevadel. Joonisel on esitatud ka kasvaja arenemise pidurduse ulatus protsentides.

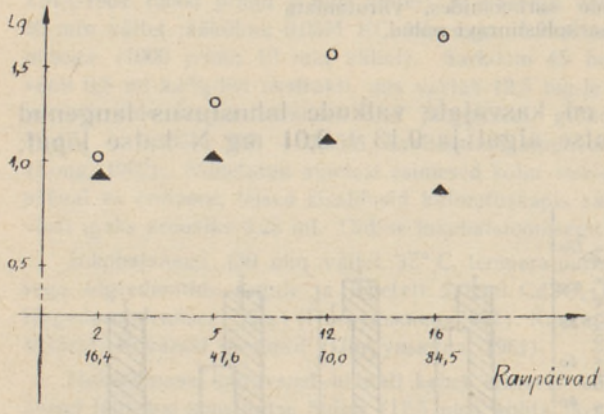
Sarkolüsiinravi toimel vähenes heksokinaasi aktiivsus 1 mg N kohta esimesel nädalal 15%; teisel nädalal aga esines tunduvaid kõikumisi: 12. ravipäevaks heksokinaasi aktiivsus tõusis 42% (638 ± 73), võrreldes lähteväärtusega, ja 16. ravipäevaks langes 43,5% (301 ± 39).

Heksokinaasi aktiivsus, arvutatud lähtekoele, vähenes sarkolüsiiniga ravitud loomadel kasvaja ekstraktis esimese nädala jooksul keskmiselt 20%, 16. ravipäevaks 73% ($P_{dif} < 0{,}001$; 27,2 ± 0,6 µg katse lõpul).



Joon. 3. Sarkoom 45 ekstrakti lämmastikusisaldus. Viirutatud tulbad väljendavad kasvaja ekstrakti valgulämmastiku hulka milligrammides kontroll-loomadel, viirutamata — katseloomadel.

Sarkolüsiinravi mõjustas ka sarkoomi valgu lahustuvust. Lämmastiku hulk vähenes esimesel nädalal 8%, teisel nädalal aga juba üle 50% (P_{dif} <0,001; 0,09 ± 0,01 mg N), s. t. 20% enam kui samavanuselistes kontrollkasvajates.



Joon. 4. Sarkoom 45 keskmised kaalud ja kasvu pidurduse protsent. Sarkoomide keskmised kaalud grammides on avaldatud logaritmilisel kujul. Ringid väljendavad kasvaja kaalu kontroll-loomadel, kolmnurgad — sarkolüsiiniga ravitud loomadel. Sarkolüsiiniga saavutatud sarkoomi kasvu pidurduse ulatus Schreki järgi on näidatud ravipäevade all.

In vitro vähendas sarkolüsiin kontsentratsioonis 10^{-4} heksokinaasi aktiivsust, arvutatud lähtekoele, 10% ja heksokinaasi aktiivsust 1 mg N kohta 11%.

Katsegrupi kasvajate suuruse ja nende heksokinaasi aktiivsuse vahel esines mõõdukas seos (ϱ = = 0,45). Tihe seos oli aga katsegrupi kasvajate heksokinaasi aktiivsuse, arvutatud lähtekoe kohta, ja valgu lahustuvuse vahel (ϱ = 0,73). Ravitud kasvajate suurus ja valgu lahustuvus ei korreleerunud omavahel (ϱ = —0,08).

Arutelu

Võrreldes kontroll-loomadel kahe erinevalt arvutatud sarkoomi heksokinaasi aktiivsuse muutusi katseperioodi vältel, võib täheldada nii nende suunas kui ka dünaamikas erinevusi. Kui kasvaja heksokinaasi aktiivsusele, arvutatud lähtekoele, on iseloomustavaks «rahulik» langustendents kasvaja vananemisel, siis heksokinaasi aktiivsusele, arvutatud 1 mg N kohta, on omane tunduv kõrgenemine katseperioodi lõpuks, mis seletub kasvaja valgu lahustuvuse vähenemisega seoses tema denatureerumisega (Бреслер, Селезнева, 1952). Sellepärast langesid sarkoomi vananemisel glükoosi kadu ja valgu lahustuvus, kuid nende jagatis kui heksokinaasi aktiivsus 1 mg N kohta tõusis. Seetõttu näib, et heksokinaasi aktiivsus, arvutatud 1 mg N kohta, ei anna meie katsetingimustes fermendi funkt-

sioonist, s. o. võimest fosforüleerida glükoosi, õiget ettekujutust. Seepärast peame heksokinaasi aktiivsuse muutuste uurimisel kasvajakoes õigemaks teha arvutused lähtekoe hulga kohta.

Sarkolüsiinravi puhul tulevad ainevahetuse näitajate ebaühtlased muutused veel aktsentueeritumalt esile. Sarkolüsiinravi vähendab lähtekoe kaalu alusel arvutatud sarkoomi heksokinaasi aktiivsust teisel ravinädalal 73% ja valkude lahustuvust 50%. Samal ajal on 1 mg N kohta arvutatud heksokinaasi aktiivsus ebastabiilne: see tõusis 12. ravinädalal 42% ja langes 16. ravipäeval 43,5%. Selle põhjuseks oli valkude lahustuvuse tunduva vähenemise varasem algus, võrreldes languse algusega heksokinaasi aktiivsuses, mis viitab valkude tundlikkusele sarkolüsiini suhtes. Heksokinaasi aktiivsuse tugevast pärssimisest teise nädala lõpul tuleb järeldada, et sarkolüsiin avaldab sarkoom 45 heksokinaasile märksa suuremat mõju kui sarkoomi valkude lahustumisele.

Kokkuvõte

1. Sarkoom 45 heksokinaasi aktiivsus sõltub kasvaja vanusest, mida senistes uurimustes pole küllaldaselt arvestatud ja mis seetõttu võivad valmistada raskusi kirjandusandmete interpreteerimisel.

2. Sarkoom 45 vananemisel väheneb lähtekoe kaalule arvutatud heksokinaasi aktiivsus teise nädala lõpuks 12%. Valkude lahustuvus väheneb 31,5%. 1 mg N kohta arvutatud heksokinaasi aktiivsus suureneb kasvaja vananemisel 28%, mis ei peegelda kasvaja tõelist ainevahetuse seisundit.

3. Sarkolüsiinravi, mis pidurdab sarkoomi kasvu, vähendab ka kasvaja heksokinaasi aktiivsust.

KIRJANDUS

Bellelli L., 1961. The action of nitrogen mustards on the glycolysis and hexokinase activity of rat reticulosarcoma ascites cells. Oncologia **14** (4) : 254—258.

Boyland E., Goss G. C. L., Williams-Ashman H. G., 1951. The hexokinase activity of animal tumours. Biochem. J. **49** (3) : 321—324.

Burk D., 1957. Über die Begründung einer Chemotherapie des Krebses auf der Grundlage einer primären Hemmung der Glucosephosphorylierung (Hexokinase-Reaktion) durch Beeinflussung von Substrat, Coenzym und Enzym. Klin. Wochenschr. **35** (22) : 1102—1104.

Eltzina N. W., Heise E., 1965. Bestimmung der Michaelis-Konstante der Hexokinase in Normal- und Tumorgeweben. Acta Biol. Med. Germ. **14** (2) : 114—118.

Griffin A. C., 1960. The metabolism of the cancer cell. In: W. W. Nowinski, Fundamental Aspects of Normal and Malignant Growth: 880—895.

Kiesow L., Kattner W., Schmitz U., 1960. Über das erste phosphorylierende Ferment der Gärung im normalen Stoffwechsel und im Krebsstoffwechsel. Naturforsch. **15b** : 487—494.

Long C., 1952. Studies involving enzymic phosphorylation. Biochem. J. **50** (3) : 407—414.

LePage G. A., 1948. Glycolysis in tumour homogenates. J. Biol. Chem. **176** (3) : 1009—1020.

Schlief H., Schmidt C. G., 1955. Untersuchungen über das Verhalten von Hexokinase, Aldolase, Phosphomonoesterasen und Adenosintriphosphatase im Mäuse-Ascites-Tumor. Naturwissenschaften **42** (4) : 104—105.

Schrek R. A., 1935. A quantitative study of the growth of the Walker rat tumor and Flexner-Jobling rat carcinoma. Amer. J. Cancer **24** : 807—822.

Sydow G., 1964. Die Hexokinase-Aktivität in Homogenaten normaler regenerierender und präcanceröser Rattenleber sowie in primären und transplantierten Hepatomen. Acta Biol. Med. Germ. **12** (4) : 517—518.

Warburg O., 1923. Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. Biochem. Z. **142** : 317—338.

Warburg O., 1956. On the origin of cancer cells. Science **123** (3191) : 309—314.

Бреслер С. Е., Селезнева Н. А., 1952. О кристаллизации ресинтезированного белка. ДАН СССР 84 (4) : 1013—1016.
Каминский Л. С., 1964. Статистическая обработка лабораторных и клинических данных. Л.
Ларионов Л. Ф., 1962. Химиотерапия злокачественных опухолей. М.
Нейфах С. А., Фомина М. П., 1957. О влиянии активности гексокиназы на скорость гликолиза в скелетной мышце и в перевиваемой рабдомиобластоме. Биохимия 22 (3) : 476—485.
Петрунькина А. М., 1961. Практическая биохимия. М.
Фишер А., 1958. Статистические методы исследования. М.

NSV Liidu Meditsiiniteaduste Akadeemia
Eesti Eksperimentaalse ja Kliinilise Meditsiini Instituut

Saabus toimetusse
11. III 1966

Э. РОЗЕ

ОБ АКТИВНОСТИ ГЕКСОКИНАЗЫ САРКОМЫ 45 И ЛЕЧЕНИИ ЕЕ САРКОЛИЗИНОМ

Резюме

Изучалась динамика активности гексокиназы (АГ) в экстрактах крысиной саркомы 45. В опухолях контрольных животных на поздних стадиях развития саркомы АГ повысилась на 28%. Причина изменения — понижение растворимости саркомных белков на 31,5%. При лечении носителей саркомы 45 в течение двух недель сарколизином в дозе 2 *мг/кг* ежедневно интраперитонеально процент торможения роста опухоли составлял 84,5. При этом АГ понизилась на 43,5, а растворимость саркомных белков — на 50%. Обсуждается необходимость учета степени развития опухолей при интерпретации биохимических сдвигов.

Эстонский институт экспериментальной и клинической медицины Академии медицинских наук СССР

Поступила в редакцию
11/III 1966

E. ROSE

ON THE HEXOKINASE ACTIVITY OF SARCOMA 45 AND ITS TREATMENT WITH SARCOLYSINE

Summary

The dynamics of the hexokinase activity in extracts of the transplantable rat Sarcoma 45 have been studied. The hexokinase activity of the non-treated tumors increases slightly during two weeks, in dependence upon a diminished solubility of proteins in advanced tumors. A treatment of the host bearing Sarcoma 45 with sarcolysine in a dosis of 2 mg/kg body wt. intraperitoneally for two weeks, resulted in a percentage of inhibition of the growth being 84.5. The hexokinase activity diminished at the same time in 43.5 per cent, so did the solubility of tumour proteins at the rate of 50 per cent. The author discusses the inevitability of taking into consideration the stage of development of tumors at the interpretation of the biochemical shifts, as presented by various investigators.

Academy of Medical Sciences of the USSR,
Estonian Institute of Experimental and Clinical Medicine

Received
March 11, 1966