

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577 151-615.35-616 988.6

©Коллектив авторов

### РЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИПЕПТИДА "ДЕГЛУТАМ" НА ГЛУТАМИНМЕТАБОЛИЗИРУЮЩУЮ СИСТЕМУ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОСАРКОМЫ SM-1

*Т.Ч. Валюк, М.Г. Величко, Л.И. Нефёдов*

Институт биохимии НАН Беларуси,  
Бульвар Ленинского Комсомола 50, 230017 Гродно, Беларусь,  
тел/факс. (375 152) 33 41 21, эл.почта: val@biochem.unibel.by

Изучали влияние модифицированного нами антинеопластона AS2-1, в составе которого изменено соотношение исходных композиций производных L-фенилаланина и L-глутамината, на активность глутаминсинтетазы, двух изоформ глутаминатазы в клетках карциносаркомы SM-1, массу опухоли, процент гормождения роста опухоли и индекс эффективности крови у крыс-опухолоносителей SM-1. Препарат вводили внутривентриально или внутривентриально в дозе 125 мг/кг два раза в сутки в течении 12 дней, начиная с 7 дня после прививки опухоли. В период интенсивного роста изучаемой неопластической ткани выявлена активация глутаминметаболитизирующих ферментов. Установлено дозозависимое действие дипептида "Деглутам" на изученные ферменты, что определяется способом введения препарата. Для клеток карциносаркомы SM-1 внутривентриальное введение препарата оказывает эффект на ферменты метаболизма глутамината, прослеженный нами ранее в ткани печени. Вводимый модифицированный препарат ANP AS2-1 вмешивается в регуляцию обмена глутамината в клетках карциносаркомы SM-1, возможно, вследствие образования в тканях организма-опухолоносителя субстрата - аналога глутамината, близкого по структуре, но отличающегося по механизму действия. С другой стороны, не исключено, что в ткани опухоли изучаемые ферменты имеют иное родство к глутамину, что объясняет большую эффективность синтетического препарата на основе производных L-глутамината, чем сама аминокислота.

**Ключевые слова:** дипептид "Деглутам", антинеопластоны, глутаминсинтетаза, фосфат-зависимая глутаминатаза, фосфат-независимая глутаминатаза, карциносаркома SM-1.

**ВВЕДЕНИЕ** Из-за интенсивного роста, требующего пластических и энергетических ресурсов [1], и особенностей изоферментного спектра, наделяющего опухоль высокой конкурентноспособностью, она становится ловушкой различных питательных веществ [2], индуцируя формирование их функционального дефицита в организме-опухолоносителе [1].

В опытах с меченым L-глутамином показано его поступление из организма-опухолоносителя в развивающуюся неопластическую ткань [3-5]. Поэтому в последнее десятилетие в онкологическую практику входят соединения на основе L-глутамината и его производных в качестве противоопухолевых препаратов. Представителями таких препаратов являются антинеопластоны (ANP), синтезируемые на базе производных L-глутамината и L-фенилаланина в различных

соотношениях [6,7]. Однако, характеристика механизмов реализации метаболической активности ANP затруднена без учета активности ферментов, определяющих реальные концентрации L-глутамин и участвующих в процессах его синтеза (глутаминсинтетаза) и утилизации (глутаминаза).

Целью настоящего исследования явилось изучение действия модифицированного нами ANP AS2-1, в составе которого изменено соотношение исходных композиций производных L-фенилаланина и L-глутамин (авторское название "Деглутам") [8], при его внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении на активность глутаминсинтетазы и двух изоформ глутаминазы в клетках карциносаркомы SM-1 крыс-опухоленосителей.

**МЕТОДИКА** На 100 белых половозрелых крысах-самцах линии Wistar CRL:(WI) WU BR с подкожно перевитой медленно растущей карциносаркомой SM-1 проведено 3 серии экспериментов. Животные массой 180-200 г (индивидуальные массы колебались в пределах 10-15 %) были разделены на три группы по 10 крыс в каждой во всех экспериментальных сериях: крысы первой группы служили контролем, получавшим внутрибрюшинную инъекцию хлорида натрия в дозе 125 мг/кг 2 раза в сутки с интервалом 12 часов (контроль на манипуляцию - контроль II); крысам второй и третьей групп по 2 раза в сутки с интервалом 12 часов внутрибрюшинно (в/б) - опыт I, и внутрижелудочно (в/ж) - опыт II, вводили "Деглутам" в дозе 125 мг/кг массы тела. Препарат "Деглутам" представляет собой композицию L-фенилацетата и N-фенилацетил-L-глутамин в соотношении 3,5.1,5 (в форме натриевой соли), разведенную на физрастворе [2]. В качестве общего контроля была отобрана группа интактных животных-опухоленосителей в количестве 10 штук (фоновый контроль - контроль I), декапитацию которых проводили на 7 сутки после перевивки опухоли.

Крысы первой серии экспериментов получали препарат 8 раз в течение 4 суток в суммарной дозе 1000 мг/кг; крысы второй серии - 16 раз в течение 8 суток в суммарной дозе 2000 мг/кг; крысы третьей серии - 24 раза в течение 12 суток в суммарной дозе 3000 мг/кг. Первое введение в каждой группе было сделано на 7 сутки после перевивки опухоли.

Декапитацию животных осуществляли с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным и международных правил "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" в первой серии опытов на 11, во второй серии - на 16, в третьей серии - на 21 сутки после перевивки опухоли.

Для исследования были получены образцы ткани карциносаркомы SM-1 из группы контроля I (на 7 сутки после перевивки опухоли), из контроля II, опыта I и опыта II (на 10-11 сутки - I серия, 15-16 сутки II серия и 20-21 сутки - III серия экспериментов), которые фиксировали в жидком азоте и хранили до анализа.

Ткань опухоли экспериментальных животных гомогенизировали при температуре +2-+4°C в 0,25 М сахарозе (рН 7,4), содержащей 5 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА и тритон X-100, в стеклянном гомогенизаторе со стеклянным пестиком при постоянной скорости 600 об/мин. Соотношение ткани и среды выделения 1:10. Гомогенат центрифугировали 5 мин при 10000 g. В полученном супернатанте из ткани опухоли спектрофотометрически (VSU-2P; Spekol 221) при 540 нм определяли активность глутаминсинтетазы (ГС) (мкмоль  $\gamma$ -ГТК/мин/мг белка) по методу Бокши и соавт. [9] в нашей модификации, фосфат-зависимой (ФЗГ) и фосфат-независимой (ФНГ) глутаминаз (мкмоль ДХФИФ/мин/мг белка) по разработанным нами методикам [10,11]. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [12]. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Graph Pad Prism (t-тест; ANOVA, dunnett's test).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В различные сроки роста карциносаркомы SM-1 активность исследуемых ферментов обмена глутамин меняется по-разному. Согласно полученным нами данным, в группе опухоленосителей без воздействий испытуемым препаратом (контроль II) на 10-11

сутки после перевивки карциносаркомы SM-1 наблюдается значительная активация ГС (в 2,4 раза) и ФЗГ (в 3,2 раза) по отношению к фоновому контролю, однако к 15-16 суткам неопластического роста данные показатели возвращаются к значениям фонового контроля (табл. 1). Активность ФНГ на протяжении испытываемого периода остается стабильной, и только на 15-16 сутки опухолевого роста выявляется некоторое увеличение активности фермента (в 1,8 раза) по отношению к фоновому контролю (табл. 1).

Таким образом, очевидно, что активация глутаминметаболизирующих ферментов в клетках карциносаркомы SM-1 наиболее выражена в период интенсивного роста опухоли.

Таблица 1. Изменение активности глутаминметаболизирующих ферментов в ткани карциносаркомы SM-1 (n=40) по мере ее роста

Исследуемые показатели	Фоновый контроль	Время после перевивки, сут.		
		10-11	15-16	20-21
ГС (мкмоль $\gamma$ -ГТК/мин/мг белка)	0,47 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,59 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,46 $\pm$ 0,03
ФЗГ (мкмоль ДХФИФ/мин/мг белка)	4,76 $\pm$ 0,76	15,09 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	5,95 $\pm$ 0,97	2,33 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
ФНГ (мкмоль ДХФИФ/мин/мг белка)	2,42 $\pm$ 0,11	3,97 $\pm$ 1,07	4,40 $\pm$ 1,05	2,95 $\pm$ 0,58

Примечание: <sup>a</sup> -  $p < 0,05$  - достоверно по отношению к фоновому контролю

Вводимый внутривенно новый противоопухолевый препарат "Деглутам" оказывает регуляторное и дозозависимое действие на глутаминметаболизирующие ферменты. В 1-й серии наших экспериментов на фоне внутривенного введения препарата в суммарной дозе 1000 мг/кг отмечалось снижение активности ФЗГ в 3,4 раза и увеличение активности ФНГ в 4,2 раза по отношению к контролю II. Во 2-й серии, когда суммарная доза вводимого "Деглутама" составила 2000 мг/кг, наблюдалась активация ГС в 3,7 раза, ФЗГ - в 2,8 раза, ФНГ - 6,4 раза по отношению к контролю II. В дальнейшем, при введении "Деглутама" в дозе 3000 мг/кг значения активности изученных ферментов в ткани карциносаркомы SM-1 приближались к значениям контроля II, но в то же время прослеживалась тенденция к активации (табл. 2). Как видно из приведенных нами данных, особенно чувствительной к действию данного препарата оказались глутаминметаболизирующие изоферменты, активность которых на фоне введения препарата увеличивалась в несколько раз, в связи с чем можно предположить, что, возможно, исследуемые соединения являются субстратами - аналогами глутамина. Кроме того, наиболее выраженные эффекты на

Таблица 2. Активность глутаминметаболизирующих ферментов в клетках карциносаркомы SM-1 (n=100) на фоне введения препарата "Деглутам" в дозе 125 мг/кг 2 раза в сутки на 7 сутки после перевивки

исследуемые показатели	серия экспериментов	группа животных-опухоленосителей		
		контроль II	«Деглутам» в/ж	«Деглутам» в/бр
ГС (мкмоль $\gamma$ -ГТК/мин/мг белка)	1	1,13 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,10	0,52 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
	2	0,59 $\pm$ 0,03	2,18 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	1,85 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>
	3	0,46 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,04	1,47 $\pm$ 0,30 <sup>ab</sup>
ФЗГ (мкмоль ДХФИФ/мин/мг белка)	1	15,09 $\pm$ 0,75	4,40 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	4,95 $\pm$ 1,41 <sup>a</sup>
	2	5,95 $\pm$ 0,97	16,49 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	5,73 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>
	3	2,33 $\pm$ 0,23	3,94 $\pm$ 0,88	17,43 $\pm$ 5,65 <sup>ab</sup>
ФНГ (мкмоль ДХФИФ/мин/мг белка)	1	3,97 $\pm$ 1,07	3,97 $\pm$ 1,07	4,42 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>
	2	4,40 $\pm$ 1,05	28,32 $\pm$ 7,42 <sup>a</sup>	20,15 $\pm$ 7,11 <sup>a</sup>
	3	2,95 $\pm$ 0,58	3,97 $\pm$ 0,60	10,23 $\pm$ 2,82 <sup>ab</sup>

Примечание: <sup>a</sup> -  $p < 0,05$  - достоверно по отношению к контролю; <sup>b</sup> -  $p < 0,05$  - достоверно по отношению к группе с внутривенным введением препарата

## ДИПЕПТИД "ДЕГЛУТАМ" И ОБМЕН ГЛУТАМИНА В КАРЦИНОМЕ

глутаминметаболизирующие ферменты нами отмечены при внутрижелудочном введении "Деглутама" в суммарной дозе 2000 мг/кг (15-16 сутки роста опухоли).

Закономерности, наблюдаемые при внутрижелудочном введении "Деглутама", нами не прослеживаются при введении исследуемого препарата внутривенно. В 1-й экспериментальной серии активность ГС и ФЗГ снижалась в 2,2 и 3 раза соответственно, тогда как во 2-й серии наблюдалась активация ГС (в 3,1 раза) и ФНГ (в 4,6 раза) по отношению к контролю II. Наиболее выраженные изменения выявлены в 3-й серии, когда суммарная вводимая доза составила 3000 мг/кг. Активность всех изученных ферментов вырастала в 3,2 раза (ГС), 7,5 раза (ФЗГ) и 3,5 раза (ФНГ) по отношению к контролю II (табл. 2). Однако как и при внутрижелудочном введении, отмечается зависимость от дозы вводимой композиции.

Таким образом, на основании всего выше изложенного, для клеток карциномы SM-1 введение нового противоопухолевого препарата "Деглутам" имеет важное значение, так как его внутрижелудочное введение оказывает эффект на ферменты метаболизма глутамин, прослеженный нами ранее в ткани печени [13]. Дозозависимый эффект, сопровождающийся активацией всех глутаминметаболизирующих ферментов, определяется способом введения препарата (табл. 2).

Таблица 3. Масса опухоли, процент торможения роста опухоли и индекс эффективности крови у крыс-опухоленосителей SM-1 при введении препарата "Деглутам" в дозе 125 мг/кг 2 раза в сутки на 7 сутки после перевивки в течение 12 дней

	Контроль II	«Деглутам» в/ж	«Деглутам» в/бр
на 11 сутки после перевивки опухоли			
Масса опухоли, г	1,621±0,540	2,483±0,767	1,967±0,952
Процент торможения роста опухоли		-53,18	-21,34
Индекс эффективности		0,65	0,82
на 15 сутки после перевивки опухоли			
Масса опухоли, г	9,27±3,15	10,07±3,27	6,50±4,01
Процент торможения роста опухоли		-8,63	29,88
Индекс эффективности		0,92	1,43
на 20 сутки после перевивки опухоли			
Масса опухоли, г	30,43±2,66	17,21±9,32	16,00±4,36*
Процент торможения роста опухоли		43,44	47,42
Индекс эффективности		1,77	1,90

Примечание: \* -  $p < 0,05$  - достоверно по отношению к контролю

Оценка изменения массы опухоли показала, что на 20-21 сутки после перевивки опухоли различные способы введения нового противоопухолевого препарата приводят к снижению массы в 2 раза по отношению к контролю II. Процент торможения роста опухоли в этот период составил 43,44 - для в/ж введения и 47,42 - для в/бр введения препарата и индекс эффективности 1,77 и 1,90 для в/ж и в/бр введений, соответственно (табл. 3).

Таким образом, вводимый модифицированный нами препарат ANP AS2-1, содержащий производные L-глутамин, вводится в регуляцию обмена глутамин в клетках карциномы SM-1, возможно, вследствие образования в тканях организма-опухоленосителя субстрата - аналога глутамин, близкого по структуре, но отличающегося по механизму действия. Не исключено, что в ткани опухоли изученные ферменты имеют иное сродство к глутамину, чем может объясняться большая эффективность синтетического препарата на основе производных L-глутамин.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Нефёдов Л.И. (1999) Таурин (биохимия, фармакология, медицинское применение), Гродно.
2. Лихтенштейн А.В., Шанот В.С. (1998) Патол. физиол. exper. тер., №3, 23 - 44.

3. *Carter P., Welbourne T.* (1997) *Am. J. Physiol.*, **273**, 521 - 527.
4. *Curi T.C., De Melo MP, De Azevedo R. B.* (1997) *Am. J. Physiol.*, **273**, 1124-1129.
5. *Schnizer H.G., Boehlein S.K., Stewart J.D.* (1999) *Biochemistry*, **38**, 3677-3682.
6. *Burzynski S.R., Stolzmann Z., Szopa B.* (1997) *Physiol. Chem. Phys.*, **9**, 485-500.
7. *Burzynski S.R., Burzynski B., Mohhabat M.O.* (1986) *Drugs. Exp. Clin. Res.*, **12**, 25-35.
8. *Нефёдов Л.И., Величко М.Г., Каравай А.В., Леднёва И.О., Валюк Т.Ч.* (1999) Препарат, содержащий производные L-глутамина, обладающий противоопухолевой активностью. Заявка № а 19990937 на выдачу патента РБ. Приоритетная спр. - Заявл. 15/10/1999
9. *Бокша И.С., Терешкина Е.Б., Бурбаева Г.Ш.* (1995) *Биохимия*, **60**, 1697-1705.
10. *Валюк Т.Ч., Нефёдов Л.И., Величко М.Г.* (2001) Реакционный состав для определения активности фосфат-зависимой глутаминазы в биологических образцах. Заявка № а 20010504 на выдачу патента РБ. Приоритетная спр. - Заявл. 30/08/2001
11. *Валюк Т.Ч., Нефёдов Л.И., Величко М.Г.* (2001) Реакционный состав для определения активности фосфат-независимой глутаминазы в биологических образцах. Заявка № а 20010503 на выдачу патента РБ. Приоритетная спр. - Заявл. 30/08/2001
12. *Северин С.Е., Соловьева Г.А.* (ред.) (1989) *Практикум по биохимии М.: изд-во МГУ.*
13. *Валюк Т.Ч., Нефёдов Л.И., Величко М.Г.* (2001) Аминокислоты и их производные в биологии и медицине: Материалы II междунар. науч. конф., Гродно: ГрГУ, 12 - 14.

Поступила 25.06.2003

#### THE REGULATORY ACTION OF DIPEPTIDE "DEGLUTAM" ON THE GLUTAMINE METABOLIZED ENZYMES IN THE CARCINOSARCOMA SM-1 CELLS

*T.Ch. Valiuk, M.G. Velichko, I.I. Nefyodov*

Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Belarus  
BLK 50, 230017 Grodno, Belarus, tel/fax: (375 152) 33 41 21

The influence of modified antineoplaston AS2-1 (with altered ratio of L-phenylalanine and L-glutamine derivatives, "Deglutam") on the activity of glutamine synthetase, glutaminase isoforms in the carcinosarcoma SM-1, tumor weight, per cent of the inhibition of tumor growth and blood impact index was investigated in rats with carcinosarcoma SM-1. The preparation was administered in the dose of 125 mg/kg twice a day for 12 days (on the 7th day after tumor transplantation). Intensive growth of carcinosarcoma SM-1 was accompanied by activation of the glutamine metabolizing enzymes. The dose-response effect of "Deglutam" on the studied enzymes depended on the mode of preparation administration. The intragastric administration of the preparation caused the same effect on the glutamine metabolizing of SM-1 cells; as it was earlier observed in rat liver. Administration of the modified preparation ANP AS2-1 (containing L-glutamine derivatives) influences regulation of glutamine metabolism in carcinosarcoma SM-1 cells, possibly, due to formation of substrates in the tissues of the tumor-bearing body similar to glutamine. It is also possible that in the tumor tissues these enzymes have different affinity to glutamine. This may explain greater effectiveness of the synthetic preparation on the basis of L-glutamine derivatives rather than the amino acid itself.

**Key words:** dipeptide "Deglutam", antineoplastons, glutamine synthetase, phosphate-dependent glutaminase, phosphate-independent glutaminase, carcinosarcoma SM-1.