

У самок F_{2m} обнаружены, кроме того, две аденокарциномы эндометрия, отсутствовавшие в контроле. Отмечено повышение по сравнению с контролем опухолей яичников (см. табл. 1 и 2), среди которых была одна злокачественная гранулезоклеточная опухоль с метастазами в легкие.

При прямом действии ДЭС отмечено появление гистиоцитарных сарком матки у родителей (4/16) и значительное учащение рака молочной железы как у родителей (8/16), так и в F_1 ДЭС (34,8 %), в последнем случае разница была статистически существенной по сравнению как с контролем, так и с поколением F_{2m} (см. табл. 2).

Частота опухолей у самцов поколения F_{2m} не отличалась от таковой в контроле.

Обсуждение. Резюмируя полученные результаты, можно отметить развитие повышенной частоты опухолей матки у внучек мышей, подвергшихся действию ДЭС в последний период беременности. Результаты эти, с одной стороны, совпадают с полученными В. Walker [13] в том, что опухоли матки возникли во втором поколении, которое само действию ДЭС не подвергалось. Но есть и существенная разница: в опытах В. Walker передача канцерогенного эффекта произошла через самок, подвергшихся внутриутробному воздействию ДЭС, тогда как в наших экспериментах этот эффект был передан через самцов¹. Тот факт, что у человека от действия ДЭС возникает рак влагалища, а в наших опытах возникли саркомы матки, отражает лишь видовые и линейные особенности использованных животных. В экспериментах В. Walker также возникли опухоли матки и яичников, а не влагалища.

Что касается механизмов наблюдавшегося эффекта, то передача его через половую клетку представляется наиболее вероятной. Эстрогены не относятся к генотоксическим соединениям, однако в отношении ДЭС было показано, что некоторые из его метаболитов (хиноны) обладают способностью взаимодействовать с ДНК [5]. Говорить о каких-либо гормональных нарушениях, которые могли бы способствовать учащению опухолей матки в поколении F_{2m} , оснований нет. В предыдущих опытах [7] было показано, что персистирующий эструс может повышать частоту опухолей матки у мышей, однако нарушений эстрального цикла в поколении F_{2m} отмечено не было.

Известно, что половые клетки чувствительны к действию мутагенных объектов и что вероятность мутаций у сперматозоидов выше, чем у ооцитов [2, 6]. В экспериментах показана возможность передачи канцерогенного эффекта главным образом через мужскую половую клетку [4, 9, 11], а в отдельных случаях [4] и через женскую.

Трансгенерационный канцерогенез в наших опытах проявился в увеличении частоты опухолей,

вызываемых ДЭС при его прямом действии и являющихся спонтанными для данной линии мышей. В экспериментах В. Walker [12, 13] аденокарциномы матки, появившиеся во втором поколении, имелись и в первом поколении от прямого действия ДЭС, но спонтанно они не встречались. И в наших, и в опытах В. Walker [13] во втором поколении мышей имелось увеличение частоты опухолей яичников, не вызываемых ДЭС и не встречающихся спонтанно.

Прямое канцерогенное действие ДЭС было вначале показано в эксперименте на мышах, что затем, к несчастью, подтвердилось и на человеке. Можно лишь надеяться, что в отношении трансгенерационного канцерогенного действия ДЭС данные, полученные на мышах, не выйдут за пределы эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Турусов В. С., Томатис Л., Кабрал Р. и др. // Экспер. онкол.— 1988.— Т. 10, № 3.— С. 25—28.
2. Ehling U. K., Neuhauser-Klaus A. / Eds Y. Tazuma, S. Kondo, Y. Kuroda // Problems of Threshold in chemical Mutagenesis, Environmental Mutagen Society of Japan.— Shizuoka, 1984.— P. 15—25.
3. Gart J. J., Krewski D., Lee P. N. et al. // Statistical methods in Cancer Research. IARC Scientific Publications.— Lyon, 1986.— N 79.— P. 219.
4. Nomura T. // Nature.— 1982.— Vol. 296.— P. 575—577.
5. Racine R. R., Schmid B. P. // Environ. Mutagen.— 1984.— Vol. 6, N 1.— P. 211—218.
6. Russell W. L. / Eds Y. Tazuma, S. Kondo, Y. Kuroda // Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis, Environmental Mutagen Society of Japan.— Shizuoka, 1984.— P. 153—160.
7. Smirnova I. O., Turusov V. S. // Carcinogenesis.— 1988.— Vol. 9, N 11.— P. 1927—1929.
8. Tomatis L. // Perinatal and Multigeneration Carcinogenesis. Eds N. P. Napalkov, J. M. Rice, L. Tomatis & H. Yamasaki. IARC.— Lyon, 1979.— P. 1—15.
9. Tomatis L., Cabral J. P. R., Likhachev A. J., Ponomarev V. I. // Int. J. Cancer.— 1981.— Vol. 28.— P. 475—478.
10. Turusov V. S., Cardis E. // Perinatal and Multigeneration Carcinogenesis / Eds N. P. Napalkov, J. M. Rice, L. Tomatis & H. Yamasaki. IARC.— Lyon, 1989.— P. 105—120.
11. Vorobtsova I. E., Kitaev E. M. // Carcinogenesis.— 1988.— Vol. 9.— P. 1931—1934.
12. Walker B. E. // J. Nat. Cancer Inst.— 1983.— Vol. 70.— P. 477—484.
13. Walker B. E. // Ibid.— 1984.— Vol. 73.— P. 133—140.

Поступила 23.04.91

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.61-001.28-092.9:616.008

Н. В. Любимова, Л. С. Бассалык, В. В. Остапенко, Е. Г. Слесаренко, А. А. Вайсон

ФЕРМЕНТЫ МОЧИ — ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ СПОСОБ ОЦЕНКИ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК У МЫШЕЙ

НИИ клинической онкологии, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, Днепропетровский медицинский институт

Возможность оценить поражение почек, обусловленное заболеванием либо повреждающим действием какого-либо фактора, представляет большой интерес как для клиницистов, так и для экспериментаторов.

Для оценки функции почек мелких лаборатор-

¹ Доктор В. Walker любезно предоставил авторам настоящей работы статью из газеты «Washington Post» от 11 марта 1990 г., в которой сообщается о развитии рака влагалища у 13-летней девочки, отец которой подвергся действию ДЭС пренатально, т. е. когда беременная им мать получала ДЭС. Поскольку речь идет о единственном наблюдении, нельзя, естественно, исключить возможность случайного совпадения, т. е. спонтанного, не связанного с ДЭС развития рака влагалища у девочки (что само по себе представляет собой огромную редкость) с воздействием ДЭС на ее отца.

ных животных используется ряд тестов, в том числе исследование содержания белка в моче, определение общего объема мочи и гематокрита [9, 11].

В последнее время с целью диагностики поражения почек, обусловленного, в частности, токсическим действием противоопухолевых химиопрепаратов, антибактериальных и других лекарственных средств, а также при отторжении почечного трансплантата получило широкое распространение исследование активности ферментов в моче [2]. Этот метод является чувствительным, быстрым и неинвазивным, что позволяет исследовать одно и то же животное в динамике.

Установлено, что повышение в моче активности ферментов отражает поражение почечных канальцев, в большей степени — проксимального отдела нефрона [8]. В литературе пока отсутствуют сведения об экскреции с мочой ферментов при лучевом поражении почек.

Цель данной работы — исследование активности в моче ферментов, имеющих различную субклеточную локализацию в эпителии почечных канальцев (лактатдегидрогеназы — ЛДГ — в цитоплазме клеток; гамма-глутамилтрансферазы — гамма-ГТ, щелочной фосфатазы — ЩФ — в щеточной каемке эпителия; N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы — НАГ — в лизосомах в отдаленные сроки после локального облучения области почек мышей (с 20-й по 35-ю неделю), когда и развивается радиационная нефропатия [6].

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 350 мышах-самцах F₁(СВА×С57В1) массой 22—26 г. Область почек неанестезированных мышей облучали локально на рентгеновской установке «Стабилипан» (220 кВ, 15 мА, 1,8 Гр/мин) через отверстия в свинцовой диафрагме размером 13×17 мм. При однократном облучении на воздухе дозы варьировали от 11 до 18 Гр (интервал между группами 1 Гр). При фракционированном облучении (5 фракций в течение 5 дней) суммарные дозы составляли 25—35 Гр (интервал между группами 5 Гр). Контрольную группу составили 16 необлученных животных того же возраста.

Анализ белка в моче проводили нефелометрически на ФЭК-56. Результаты оценивали с помощью расчетной таблицы. При большом количестве белка мочу разводили в 5—10 раз. Пробы крови для подсчета гематокрита брали из хвостовой вены в гепаринизированные капиллярные трубки, после чего их центрифугировали в течение 10 мин при 2000 G на центрифуге «Cellocrit 2» (фирма «Linson Instrument AB», Швеция). Результаты определяли по стандартной шкале.

Для определения активности ферментов в моче сбор образцов осуществляли в утренние часы (с 8 до 10 ч). Сразу после сбора образцы центрифугировали при температуре 4 °С в течение 15 мин при 900 G. Основные сложности при исследовании ферментов в моче связаны с наличием в ней различных ингибиторов, мешающих адекватному определению ферментативной активности. Известны разные способы предварительной очистки мочи: ультрафильтрация, гель-фильтрация, диализ. По собственным и литературным данным диализ является одним из эффективных и доступных способов удаления из мочи ингибиторов ферментов [1, 2]. Другим подходом к предотвращению инактивации ферментативной активности в моче является оптимизация методических условий реакции, заключающаяся, в частности, в повышении концентрации субстрата [10].

Определение активности гамма-ГТ (ЕС 2.3.2.2), ЩФ (ЕС 3.1.3.1), НАГ (ЕС 3.2.1.30) проводили при помощи колориметрических методов [3, 5, 7]; ЛДГ (ЕС 1.1.1.27) — спектрофотометрически [4] на автоматическом селективном анализаторе «Hitachi-717E».

Исследования проводили на 20, 23 и 30-й неделе в группах мышей, облученных однократно, и на 23, 25, 30 и 35-й неделе — фракционированно. Использование методик, адаптированных для исследования ферментов в моче, а также расчет

активности ферментов на 1 ммоль креатинина мочи (Ед. акт/ммоль креат.) обеспечивали большую информативность и стабильность полученных данных [8].

Результаты исследований и обсуждение. Ферментурия, так же как и протеинурия, наблюдалась у мышей в норме. Отмечены незначительные колебания в уровне активности гамма-ГТ (23,9—31,5 Ед. акт/ммоль креат.) и НАГ (5,3—6,3 Ед. акт/ммоль креат.) в динамике наблюдения, тогда как для ЛДГ характерна вариабельность значений активности ЛДГ (4,7—9,0 Ед. акт/ммоль креат.). Для ЩФ выявлено нарастание экскреции в зависимости от времени исследования: уровень ЩФ в моче животных на последних сроках исследования (8,7—9,8 Ед. акт/ммоль креат.) в среднем в 2 раза превышал активность фермента в моче мышей в начале эксперимента (4,3 Ед. акт./ммоль креат.).

У облученных мышей выявлено усиление экскреции ферментов с мочой. Гиперферментурия в различных экспериментальных группах была выражена в разной степени, однако имела дозозависимый характер. Так, максимальное повышение активности ферментов в моче обнаружено после однократного облучения в дозе 18 Гр и фракционированного (5 фракций) в суммарной дозе 35 Гр.

При изучении мембраносвязанных ферментов (гамма-ГТ и ЩФ) более информативные результаты получены для гамма-ГТ. На 23-й и 30-й неделе после однократного облучения в дозе 18 Гр усиление секреции было выявлено во всех экспериментальных группах. Активность фермента была увеличена по сравнению с уровнем фермента в моче контрольных животных в 3 раза (соответственно 80 и 72 Ед. акт/ммоль креат.), тогда как при дозе 11—16 Гр не превышала 60 Ед. акт/ммоль креат. (рис. 1, а). При фракционированном облучении степень повышения активности гамма-ГТ в моче мышей нарастала по мере увеличения дозы и наибольший подъем активности гамма-ГТ (111,4 Ед. акт/ммоль креат.) наблюдался при 35 Гр на 35-й неделе (рис. 1, б).

При однократном облучении максимальное повышение активности ЩФ отмечено на 23—25-й неделе при 18 Гр (соответственно 37 и 41 Ед. акт/ммоль креат.) (рис. 2, а). При меньших дозах усиления секреции ЩФ с мочой не наблюдалось (11 Гр) или было выражено в меньшей степени (13—16 Гр). При фракционированном облучении степень выраженности ферментурии в разных экспериментальных группах варьировала. Наибольшее увеличение активности ЩФ (около 64 Ед. акт/ммоль креат.) выявлено после облу-

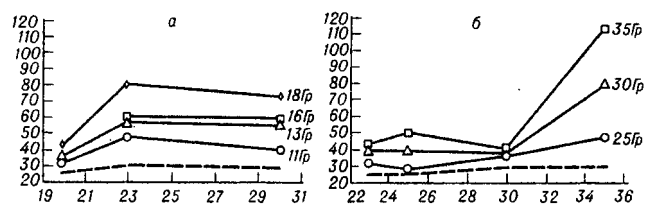


Рис. 1. Активность гамма-ГТ в моче мышей после облучения почек.

Здесь и на рис. 2—4: а — однократное, б — фракционированное облучение почек. По оси абсцисс — время после облучения (в нед.); по оси ординат — активность фермента (в Ед. акт/ммоль креат.). Пунктирные кривые на каждом рисунке — уровень фермента у контрольных животных.

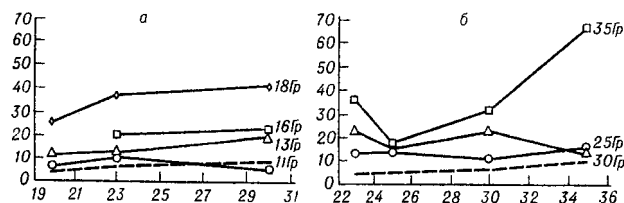


Рис. 2. Активность ЩФ в моче мышей.

чения в суммарной дозе 35 Гр на 35-й неделе (рис. 2, б).

Уровень активности ЛДГ в моче животных, облученных однократно в дозе 18 Гр, повысился по сравнению с нормой в среднем в 10 раз (20-я неделя), достигая максимума (70 Ед. акт/ммоль креат.) на 23-й неделе, тогда как при меньших дозах (11—16 Гр) активность фермента увеличилась лишь в 1,5—3,5 раза (рис. 3, а). При фракционированном режиме облучения на 23-й неделе во всех экспериментальных группах активность ферментов повышалась в зависимости от дозы, достигая максимума при 35 Гр (56 Ед. акт/ммоль креат.), что в 10 раз превышало норму. Наибольшее повышение активности фермента выявлено на 35-й неделе при 35 Гр (64,3 Ед. акт/ммоль креат.) (рис. 3, б).

Для лизосомального фермента НАГ было характерно более стабильное усиление его экскреции с мочой в процессе наблюдения. При однократном облучении максимальное увеличение активности НАГ по сравнению с нормой во всех экспериментальных группах наблюдалось при 18 Гр (соответственно 16 и 19 Ед. акт/ммоль креат. на 23—30-й неделе) (рис. 4, а). При фракционированном облучении с 20-й по 30-ю неделю различия между экспериментальными группами были менее выражены, однако дозовая зависимость при этом сохранялась. Активность НАГ на 35-й неделе после облучения в суммарной дозе 35 Гр достигла 24,8 Ед. акт/ммоль креат. (рис. 4, б), превышая норму в 5 раз.

Сравнение результатов исследования ферментов в моче мышей при разных режимах облучения показало, что в группах с однократным облучением значительное усиление экскреции ферментов с мочой наблюдалось при меньших дозах, чем у мышей с фракционированным облучением. Эти данные согласуются с общими представлениями о характере радиационного воздействия.

Представляют также интерес данные в группах с максимальными дозами облучения (18 Гр — однократное, 35 Гр — фракционированное). В поздние сроки (соответственно 30-я и 35-я недели), как правило, выявляли наибольшее повышение активности ферментов, что свидетельствовало об углублении процессов поражения почек. Необходи-

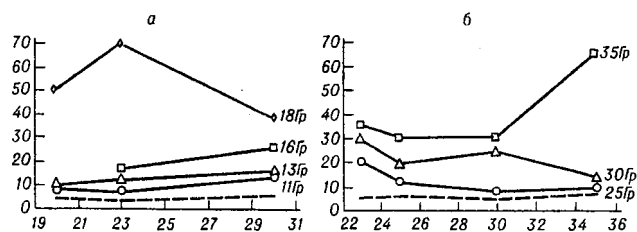


Рис. 3. Активность ЛДГ в моче мышей.

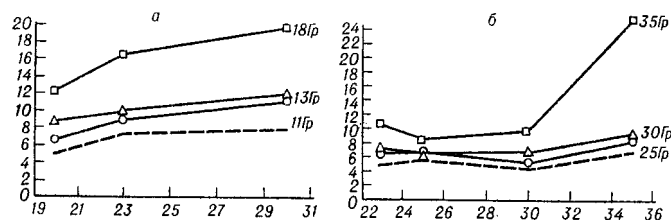


Рис. 4. Активность НАГ в моче мышей.

димо отметить, что в этот период наблюдались также подъем уровня протеинурии и падение гематокрита.

При сравнении данных активности ферментов в моче с другими лабораторными показателями установлено, что на 20-й неделе после однократного облучения в дозе 11 Гр и фракционированного в суммарной дозе 25 Гр не было зарегистрировано изменения суточного объема мочи (норма 1,6—2,1 мл), уровня гематокрита (норма 50—52 %) и протеинурии (норма 0,6—1,6 г/л), тогда как в моче этих животных наблюдалось увеличение активности ферментов. Сдвиги в активности ферментов отмечались и в более ранние сроки. По нашим предварительным данным, уже на 8—12-й неделе после облучения выявлялась тенденция к гиперферментурии, тогда как другие изучаемые показатели не отличались от нормы. Этот факт может свидетельствовать о большей чувствительности ферментурии для характеристики лучевого поражения почек.

Таким образом, ферментурия коррелирует с протеинурией лишь отчасти, что объяснимо с точки зрения патогенетических механизмов лучевого воздействия на почки: повышение в моче активности ферментов отражает повреждение почечных канальцев и не связано с нарушением процессов гломерулярной фильтрации.

Можно предполагать, что на основании степени увеличения активности в моче ферментов, имеющих различную субклеточную локализацию, можно судить о глубине повреждения почечных канальцев. В этом плане представляют интерес сравнительные исследования биохимического состава мочи и морфологических характеристик ткани почек при облучении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джумабаева Ф. Т., Пашинцева Л. П., Любимова Н. В., Басалык Л. С. // Лаб. дело. — 1988. — № 10. — С. 56—58.
2. Лавренова Т. П. // Там же. — 1986. — № 7. — С. 430—432.
3. Commission Enzymologie // Ann. Biol. clin. — 1977. — Vol. 35. — P. 271—273.
4. Flandrois C., Gravagna B., Maire I. et al. // Ibid. — 1986. — Vol. 44. — P. 486—490.
5. Goren M. P., Wright R., Osborne S. // Clin. Chem. — 1986. — Vol. 32. — P. 2052—2055.
6. Krochak R. J., Baker D. G. // Urology. — 1986. — Vol. 27, N 5. — P. 389—393.
7. Persijn J. P., van der Slik W. // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. — 1976. — Vol. 14. — P. 421—424.
8. Price R. // Toxicology. — 1982. — Vol. 23, N 1. — P. 99—134.
9. Stevens G. N., Joiner B., Denekamp J. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. — 1989. — Vol. 16. — P. 1165—1168.
10. Jung K., Klotzek S. // Clin. Chem. — 1988. — Vol. 34, N 5. — P. 1002.
11. Williams M. V., Denekamp J. // Radiat. Res. — 1983. — Vol. 94. — P. 305—317.

Поступила 12.02.91