

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1990

Том 36 выпуск 2

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1990

Volume 36 issue 2

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

13. Janoff A., White R., Carp H. et al. // Amer. J. Path.— 1979.— Vol. 97.— P. 111—136.
14. Janoff A. // Amer. Rev. resp. Dis.— 1985.— Vol. 132.— P. 417—433.
15. Lonky S. A., McCarren J. // Ibid.— 1983.— Vol. 127.— P. S9—S15.
16. Morrison H. M., Afford S. C., Stockley R. A. // Thorax.— 1984.— Vol. 39.— P. 510—516.
17. Rasche B., Hochstrasser K., Ulmer W. T. // Atemwegs-Lungenkr.— 1982.— Bd 8.— S. 288—291.
18. Stockley R. A. // Clin. Sci.— 1983.— Vol. 64.— P. 119—126.
19. Stockley R. A., Hill S. L., Morrison H. M. et al. // Thorax.— 1984.— Vol. 39.— P. 408—413.
20. Travis J., Beatty K., Wong P. S. et al. // Bull. Europ. Physiopath. resp.— 1980.— Vol. 16, Suppl.— P. 341—351.
21. Visser L., Blout E. R. // Biochim. biophys. Acta.— 1972.— Vol. 268.— P. 257—260.

Поступила 27.10.88

EFFECT OF ANTIOXIDANTS ON THE RATIO PROTEINASES:INHIBITORS IN RESPIRATORY SPACE OF MICE WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

G. O. Kaminskaya, G. Yu. Blonskaya, L. E. Gedimin

Central Institute of Tuberculosis, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow.

In three series of experiments generalized form of tuberculosis was simulated in 427 mice of CBA strain. After dissection of chest bronchoalveolar lavage was carried out and in the fluid obtained total content of protein, elastase-like and antitryptic activities were estimated. At the severe stage of the disease content of protein was increased 7-fold, antitryptic activity — 5-fold and elastase-like activity — 10-fold in the lavage. EDTA did not inhibit the elastase-like activity, i.e. the enzyme was derived only from neutrophils. All the patterns studied were unaltered after the animal treatment with α -tocopherol at a dose of 100 mg/kg (per os) within one or three weeks. *In vitro* incubation of preparations in presence of ascorbic acid at the final concentration of 0.01 M within 1 hr at 37° caused a considerable (4-6-fold) activation of the antitryptic activity simultaneously with a distinct decrease in the elastase-like activity down to physiological values. The data obtained suggest that inactivation of the reactive centre of antiproteinases by means of products of free-radical oxidation appears to be mainly responsible for disbalance of proteinases-inhibitors in tuberculosis.

© В. Ф. ВАРБАНЕЦ, 1990

УДК 616.348-006-008.931:577.152.344

В. Ф. Варбанец

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ОПУХОЛЯХ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Установлена зависимость пролиферации клеток [10], метастазирования опухоли [12], иммунного ответа [9] от соотношения активности протеиназ и их ингибиторов при опухолях различной локализации. Состояние протеолитической системы в опухолях толстой кишки изучено недостаточно; полученные результаты оказались противоречивыми [11, 13].

Нами исследована активность протеиназ и их ингибиторов в опухолевой ткани при доброкачественных новообразованиях и раке толстой кишки.

Методика

Активность протеолитических ферментов и их ингибиторов изучена в ткани опухоли, неизменной стенке кишки

и регионарных лимфоузлах. Объектами исследования служили удаленные во время операции ткани.

Активность нейтральных протеиназ определяли по гидролизу казеина при pH 6,0, активность кислых протеиназ — по расщеплению гемоглобина при pH 3,5 [6]. Активность ферментов выражали в нанокаталах на 1 кг ткани. За 1 катал принимали количество фермента, катализирующее образование 1 моля тирозина за 1 с инкубации. Содержание ингибитора протеиназ определяли по торможению протеолитической активности трипсина, измеряемой казеиновым методом, и выражали в граммах инактивированного трипсина на 1 кг ткани. Статистическую обработку полученных данных проводили методом Стьюдента.

Было обследовано 133 больных со злокачественными (рак) и доброкачественными новообразованиями толстой кишки. У 21 из них использована предоперационная лучевая терапия по интенсивной методике: 3 дня по 6,5 Гр, суммарная доза 19,5 Гр. Проводилось подвижное облучение с одного заднего поля на аппарате «Агат-Р» с источником излучения ^{60}Co . Операция выполнялась через 24 ч после окончания облучения.

Результаты и обсуждение

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют о том, что активность нейтральных и кислых протеиназ в опухолевой ткани в 1,76—2 раза выше, чем в неизменной ткани кишки. Активность ингибитора протеолитических ферментов опухоли в 1,68—1,84 раза ниже, чем в неизменной ткани. В доброкачественной опухоли прямой кишки («ворсинчатой» аденоме) активность протеолитических ферментов в 2,09—2,77 раза ниже, а активность ингибиторов протеиназ в 1,32 раза выше, чем в злокачественной опухоли. Показатели активности протеолитических ферментов и их ингибиторов статистически не отличаются от показателей в неизменной ткани прямой кишки.

При изучении удаленных регионарных лимфоузлов выявлена та же закономерность: в лимфоузлах, пораженных метастазами, активность протеолитических ферментов в 2,23—3,55 раза выше, чем в непораженных. Активность ингибитора протеиназ в лимфоузлах при метастазировании не изменяется.

Уровень активности протеиназ после предоперационного облучения прямой кишки существенно отличается от показателей в необлученных опухолях. Активность нейтральных и кислых протеиназ в облученной опухоли оказывается в 2,8—3,58 раза ниже, чем в опухоли, не подвергнутой облучению. Активность ингибитора протеиназ остается на уровне показателей необлученной опухолевой ткани. В нормальной ткани кишки, попавшей в зону облучения, также происходит уменьшение активности протеиназ без изменения активности их ингибитора.

Несмотря на различие в гистологическом строении и функциональных особенностях разных отделов толстой кишки, нами не выявлено статистически достоверных различий в показателях активности протеолитических ферментов и их ингибиторов для прямой кишки, левой и правой половин ободочной кишки.

Полученные результаты позволили охарактеризовать опухоли толстой кишки (независимо от их локализации) по степени дифференцировки аденокарциномы (табл. 2). Из 96 случаев в 27 однозначно определить гистологическую структуру опухоли не удалось.

Достоверных различий в показателях активности протеолитических ферментов и их ингибиторов в зависимости от степени дифференциров-

Активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в опухоли, неизменной ткани и лимфоузлах у больных с доброкачественными новообразованиями и раком толстой кишки

Объект исследования	n	Статистический показатель	Протеиназа, нкат/кг		Ингибитор А, г/кг
			нейтральная А	кислая А	
Толстая кишка					
правая половина:					
опухолевая ткань	19	$M \pm m$	456,06 ± 72,31	538,95 ± 84,02	0,108 ± 0,011
неизменная ткань		p	235,97 ± 72,23 <0,05	288,92 ± 51,03 <0,05	0,193 ± 0,012 <0,05
левая половина:	29	$M \pm m$	454,94 ± 71,08	511,44 ± 78,37	0,085 ± 0,010
опухолевая ткань		p	259,23 ± 49,12 <0,05	290,30 ± 51,17 <0,05	0,156 ± 0,011 <0,05
Прямая кишка					
без облучения:					
опухолевая ткань	48	$M \pm m$	548,37 ± 70,18	609,45 ± 81,34	0,106 ± 0,011
неизменная ткань		p	274,68 ± 54,13 <0,05	326,06 ± 56,18 <0,05	0,178 ± 0,013 <0,05
после облучения:					
опухолевая ткань	21	$M \pm m$	153,03 ± 38,46	217,56 ± 42,36	0,118 ± 0,011
неизменная ткань		p	97,81 ± 21,18 >0,05	126,13 ± 27,69 >0,05	0,167 ± 0,013 >0,05
Лимфатические узлы:					
пораженные метастазами	23	$M \pm m$	223,49 ± 40,43	274,98 ± 41,77	0,139 ± 0,013
не пораженные метастазами	21	p	63,07 ± 19,11 <0,05	123,07 ± 35,62 <0,05	0,144 ± 0,018 >0,05
Ворсинчатая опухоль прямой кишки	16	$M \pm m$ p	197,88 ± 37,82 <0,05	291,39 ± 43,78 <0,05	0,142 ± 0,015 <0,05

ки аденокарциномы нами не обнаружено, хотя при низкой степени дифференцировки аденокарциномы отмечается тенденция к повышению уровня активности протеиназ.

Таким образом, при опухолях толстой кишки происходят выраженные изменения в системе протеиназы — ингибитор, повышается активность нейтральных и кислых протеиназ на фоне понижения активности ингибитора протеолитических ферментов, что соответствует результатам, полученным исследователями при раке молочной железы [2], желудка [14], ЛОР-органов [4], толстой кишки [11]. Уменьшение числа имплантационных рецидивов [5], объясняемое лучевой девитализацией наиболее активных клеток [1], коррелирует со значительным снижением активности протеиназ в опухолевой ткани после облучения. В связи с тем что после облучения по интенсивной методике операция выполнялась нами через 24 ч после последнего сеанса, гистологическими исследованиями не удается выявить лучевой патоморфоз [1]. Поэтому показатели активности протеолитических ферментов в опухолевой ткани, подвергнутой облучению, могут служить критерием эффективности лучевой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

- Бердов Б. А., Цыб А. Ф., Юрченко П. И. Диагности-ка и комбинированное лечение рака прямой кишки.— М., 1986.
- Близнюк Б. Ф. // Вопр. мед. химии.— 1982.— № 4.— С. 123—126.
- Вереженко К. Н., Лосицкая В. М. // Врач. дело.— 1968.— № 2.— С. 53—55.
- Голобородько О. П., Опанащенко Г. А., Лосицкая В. М. // Вопр. онкол.— 1979.— № 11.— С. 73—74.
- Дедков И. П., Черниченко В. А. Комбинированное лечение злокачественных опухолей.— Киев, 1975.
- Левицкий А. П. Пищеварительные ферменты слюнных желез: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Одесса, 1974.
- Лосицкая В. М. // Отоларингология.— Киев, 1971.— Вып. 2.— С. 71—78.
- Петров Р. В. Иммунология.— М., 1987.
- Boyd J. B., Farb R. M., Kost F. G. // J. surg. Oncol.— 1979.— Vol. 11, N 3.— P. 275—282.
- Burtin P., Chavanel G., Fondaneche M. // Bull. Cancer.— 1984.— Vol. 71, N 5.— P. 474—480.
- Kono M., Ketsuya H., Hayaschi H. // Int. J. Cancer.— 1974.— Vol. 13, N 3.— P. 334—342.
- Peterson H., Kjartansson J. // Acta chir. scand.— 1973.— Vol. 139.— P. 219—223.
- Vasishta A., Baker P. R., Hopwood D. // Brit. J. Surg.— 1985.— Vol. 72, N 5.— P. 386—388.

Поступила 05.10.88

Таблица 2

Активность протеиназ и их ингибиторов в опухоли при различных морфологических характеристиках рака толстой кишки

Объект исследования	n	Статистический показатель	Протеиназа, нкат/кг		Ингибитор А, г/кг
			нейтральная А	кислая А	
Низкодифференцированная аденокарцинома	19	$M \pm m$ p	537,11 ± 74,17	589,57 ± 79,54	0,094 ± 0,011
Умеренно дифференцированная аденокарцинома	40	$M \pm m$ p	512,18 ± 71,28 >0,05	578,82 ± 78,31 >0,05	0,099 ± 0,010 >0,05
Высокотифференцированная аденокарцинома	10	$M \pm m$ p	456,95 ± 69,36 >0,05	526,61 ± 71,69 >0,05	0,103 ± 0,011 >0,05

Activity of proteolytic enzymes and their inhibitors was studied in malignant and benign tumors of large intestine from 133 patients. Activity of proteinases was distinctly higher in malignant tumors as compared with unaltered tissue, while in benign tumor the enzymatic activity was similar to that of unaltered tissue. Inhibitor of proteinases exhibited lower activity in malignant tumor as compared with unaltered tissue and benign tumor. After irradiation treatment of tumors activity of the proteinases inhibitor was practically unaltered, while the enzymatic activity was distinctly decreased.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 578.833.26.083.21].04:578.245.2

К. А. Бакунц, М. Г. Геворкян, Э. Б. Тазулахова,
Р. А. Захарян, Ф. И. Ершов

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНДУКТОРОВ ИНТЕРФЕРОНА (дсРНК) НА АДСОРБЦИЮ ВИРУСА

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван; НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва

В литературе имеются данные об участии системы цАМФ в реализации антивирусного и антипролиферативного эффекта наиболее активных индукторов интерферона — высокомолекулярных двуспиральных РНК (дсРНК) путем ингибирования синтеза РНК [6]. Предполагается, что цАМФ-зависимая протеинкиназа участвует в процессе активации латентной формы дсРНК-зависимой протеинкиназы. Последняя фосфорилирует α -субъединицу фактора инициации белкового синтеза [2, 3]. С другой стороны, дефосфорилирование этого фактора инициации осуществляется цАМФ-зависимой фосфопротеинфосфатазой [4]. Можно предположить, что воздействия дсРНК на клетки нервной ткани могут быть опосредованы регулируемым цАМФ фосфорилированием клеточных белков за счет активации зависимых от цАМФ протеинкиназ [9]. Нами получены результаты, свидетельствующие о том, что дсРНК действительно может индуцировать активность системы циклических нуклеотидов путем повышения уровня цАМФ, что обеспечивает относительно высокий уровень активности цАМФ-зависимой протеинкиназы в клетках головного мозга. Эта активация происходит, по-видимому, в период, предшествующий началу синтеза интерферона, и является одним из первых звеньев воздействия дсРНК на функционирование клеток головного мозга.

В настоящей работе изучена роль фосфорилирования белков плазматической мембраны клеток головного мозга в процессах адсорбции вируса энцефаломиокардита (ЭМК) мышей.

Методика

Ткани головного мозга крыс гомогенизировали в 5-кратном объеме 10 мМ $MgCl_2$. Очистку и выделение нейрональных плазматических мембран проводили по стандартному методу. При выделении цитозольной фракции гомогенизацию

проводили в буфере, не содержащем сахарозы, и центрифугировали при 100 000 g в течение 30 мин. Концентрацию белка во фракциях определяли по Лоури [8] и спектрофотометрированием.

Фосфорилирование белков проводили в инкубационной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl, pH 7,5; 10—25 мМ $MgCl_2$; 5—10 нМ (^{32}P) АТФ (0,1 мкКи/нмоль); 100 мкг белка в присутствии различных концентраций дсРНК и в ее отсутствие. Через определенные промежутки времени реакцию останавливали добавлением 50 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ) до конечной концентрации 5 % и наносили на мембранные фильтры с последующей 3-кратной отмывкой 5 % ТХУ.

Электрофорез проводили в 10—12 % полиакриламидном геле — ПАГ (в блочной модификации). Для приготовления образцов реакцию останавливали добавлением (1:1) раствора, содержащего 0,05 М трис-НСl (pH 6,8), 10 % додецилсульфат натрия (ДСН), 0,1 М ЭДТА, 15 % глицерина, 5 % меркаптоэтанол и небольшое количество бромфенолового синего. Образцы кипятят в течение 1 мин и наносят на гель (40 мкл). После проведения электрофореза гель фиксируют, окрашивают раствором кумасси бриллиантового голубого R-250 и проводят автораддиографию с использованием рентгеновской пленки РМ-1 в течение 5—7 дней.

Для получения меченого 3H -уридинного вируса ЭМК использовали 24-часовую однослойную культуру перевиваемой линии клеток L-929, которую заражали вирусом в разведении 10^{-2} , адсорбцию проводили при 37 °C в течение 1 ч. После адсорбции монослой промывали средней 199 и клетки инкубировали в той же среде с добавлением 10 % бычьей сыворотки и 3H -уридина до конечной концентрации 100 мкКи/мл в течение 24 ч. Культуральную вирусосодержащую среду осветляли при 10 000 g в течение 90 мин при 4 °C. Вирус осаждали центрифугированием при 30 000 об/мин в роторе Ti-35. Осадок ресуспендировали в буфере STE, наносили на 20 % сахарозу, центрифугировали при 36 000 об/мин в роторе SW-41 в течение 1,5 ч. Осадок вируса суспендировали в среде 199.

Монослой клеток L-929 выращивали в сцинтилляционных флаконах. В культуральную среду добавляли дсРНК в концентрации 50 мкг/мл и клетки инкубировали в течение различного времени — 1, 15, 20, 60 мин, 3 ч, среду удаляли и адсорбцию меченого вируса проводили в течение 1 ч. Затем вирус сливали, монослой тщательно трижды промывали средой 199, высушивали и заливали толуоловым сцинтиллятором. Пробы просчитывали в счетчике «Intertechnik».

Представляющая собой репликативную форму фага f-2 дсРНК (ларифан) была получена из Института микробиологии им. А. Кирхенштейна АН Латвийской ССР. Дрожжевая дсРНК была выделена из коммерческого препарата нуклеината натрия (производство Олайне).

Результаты и обсуждение

Индуктируемое дсРНК фосфорилирование белков наиболее отчетливо проявляется в мембранной фракции и цитозоле (прирост активности составляет 64 и 38 % соответственно) (табл. 1). Как известно [1, 7], цАМФ-зависимые протеинкиназы в мозге быка примерно поровну распределяются между цитозолем и тотальной фракцией, содержащей мембраны и органеллы клетки.

В присутствии дсРНК уровень фосфорилирования белков мембранной фракции повышается (рис. 1). Изучение кинетики фосфорилирования выявляет временную зависимость реакции фос-

Таблица 1

Эндогенное фосфорилирование клеточных фракций мозга крысы

Фракция	Максимальное фосфорилирование, нм/мин на 100 мкг белка		Степень активации	Прирост активности, %
	— дсРНК	+ дсРНК		
Цитозоль	5040	6960	1,38	38 %
Мембраны	3750	6145	1,54	64 %
Ядра	2305	2580	1,12	12 %