

УДК 616-006 : 577.156
© Коллектив авторов

ЦИСТЕИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ И ИХ ИНГИБИТОРЫ ПРИ РАЗВИТИИ МЫШИНОЙ НА-1 ГЕПАТОМЫ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

*О. Н. Потеряева¹, Т. А. Короленко¹, И. Г. Свечникова¹, С. Я. Жанаева¹,
О. В. Фаламеева¹, В. И. Каледин², Д. В. Новицки³*

¹ТУ НИИ физиологии СО РАМН; Институт биохимии СО РАМН, Новосибирск;

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

³Новицки фарма, Австрия

Развитие асцитной формы гепатомы НА-1 у мышей сопровождается повышением активности катепсина В в опухолевых клетках, увеличением активности катепсина D и прокатепсина В в асцитной жидкости. Изменение активности изученных протеиназ происходит также в печени и селезенке мышей-опухоленосителей. Рост гепатомы НА-1 сопровождается снижением содержания ингибиторов цистеиновых протеиназ - цистатина С и стефина А в опухолевых клетках и в ткани печени (в меньшей степени) и количества стефина А - в селезенке. У мышей с асцитной опухолью НА-1 содержание цистатина С в сыворотке крови в 3 раза снижено по сравнению с интактными животными. Противоопухолевый препарат "Украин" увеличивал продолжительность жизни мышей с НА-1 гепатомой и снижал ежедневный прирост массы опухоли. Введение "Украина" приводило к увеличению количества макрофагов в асците, увеличивало содержание цистатина С в клетках опухоли, но не оказывало влияния на активность катепсинов В и L. Возможно, противоопухолевый эффект "Украина" связан с повышением содержания эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ, в частности, цистатина С, в клетках опухоли.

Ключевые слова: катепсины В, L и D, стефин А, цистатин С, НА-1 гепатома, Украин.

ВВЕДЕНИЕ. Катепсины В и L, наряду с сериновыми и аспартильными протеиназами, а также металлопротеиназами, участвуют в протеолитическом каскаде, который приводит к деструкции внеклеточного матрикса, распространению опухолевых клеток и метастазированию [1]. Повышение активности цистеиновых протеиназ, в частности катепсинов В и L, наблюдается при развитии ряда опухолей человека [2-4] и мышинной лимфосаркомы [5]. Активность и экспрессия катепсинов В и L значительно выше в группе опухолей, обладающих метастатическими свойствами [6]. Кроме того, катепсин В может также участвовать в процессе активации протеаз, способных переваривать внеклеточный матрикс [7]. Катепсин D является медиатором выработки интерферона- γ и ФНО- α [8].

Контроль за функциональной активностью протеиназ осуществляется внутри- и внеклеточными ингибиторами. Патологическая секреция протеиназ при новообразованиях сопровождается расходом их ингибиторов и нарушением соотношения протеиназы/ингибиторы протеиназ, снижение последних ведет к неконтролируемому росту опухоли [9].

ЦИСТЕИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ И ИХ ИНГИБИТОРЫ ПРИ ГЕПАТОМЕ

Цель настоящей работы: изучить активность цистеиновых и аспартильных протеиназ (катепсинов В, L, D), а также содержание основных ингибиторов цистеиновых протеиназ: внеклеточного - цистатина С и внутриклеточного - стефина А при развитии мышиной НА-1 гепатомы и экспериментальной противоопухолевой терапии.

МЕТОДИКА. Эксперименты проведены на 3-4-месячных мышах-самцах линии A/Sp, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН. В работе использован перевиваемый штамм гепатокарциномы НА-1, первично индуцированной у мыши-самца линии A/He *орто*-аминоазотолуолом [10]. После серии подкожных пассажей опухоль была переведена в асцитную форму и криоконсервирована. Размороженную опухоль адаптировали на животных путем 1-2 внутрибрюшинных пассажей и развившиеся асцитные клетки использовали для перевивки подопытным мышам. После перевивки опухоли животные были разделены на 6 групп, в каждой по 8-10 особей.

На 3-й день после трансплантации опухоли мышам 1-й группы внутривенно вводили препарат "Украин" (Ukrain) ("Nowicky Pharma", Австрия) в дозе 0,5 мг на 20 г массы тела; мышам 2-й группы - аналогично вводили физиологический раствор. Животным 3-й группы вводили 5 инъекций Украина в той же разовой дозе через каждые 48 часов, а мышам 4-й группы так же физиологический раствор. Пятую группу составляли интактные мыши (без опухоли). В установленные сроки часть мышей умерщвляли декапитацией, забирали кровь, печень и селезенку; учитывали объем асцита и количество в нем опухолевых клеток. Об эффективности лечения судили по уменьшению количества асцита по сравнению с нелеченым контролем.

Терапевтическую эффективность препаратов оценивали по увеличению продолжительности жизни мышей и замедлению роста экспериментальных метастазов опухоли в печени. В этих опытах клетки опухоли НА-1, отмытые от асцитной жидкости, трансплантировали мышам внутривенно по 10^5 клеток в 0,5 мл физиологического раствора. Украин животным вводили как указано выше. В качестве позитивного контроля в этих экспериментах использовали противоопухолевый препарат платин (цис-дигидроксиламиндихлороплатинаII, Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия), эффективный в отношении данной опухоли [10]. Платин вводили животным также в хвостовую вену. Эффективность лечения оценивали по увеличению продолжительности жизни мышей с опухолью и по уменьшению скорости роста имплантатов опухоли в печени. Массу опухоли в печени рассчитывали по формуле, приведенной в работе [10]: $(HI_t - HI_c) / (p \times 1000)$, где HI_t - печеночный индекс опухоли индивидуальной мыши; HI_c - средний печеночный индекс у интактных мышей данной линии и пола (в наших экспериментах он был равен 0,046); p - вес тела мыши-опухоленосителя в г, а 1000 - коэффициент, трансформирующий этот показатель в мг.

Содержание цистатина С, стефина А и активность катепсинов В, L и D исследовали в опухолевых тканях, гомогенатах печени, селезенки, асцитный клетках, асцитной жидкости, сыворотке крови. Гомогенаты тканей готовили на 0,25 М сахарозе с добавлением 1 мМ ЭДТА, pH 7,2-7,4. Для определения активности цистеиновых протеиназ и содержания ингибиторов пробы обрабатывали тритоном X-100 в конечной концентрации 0,1%. Активность катепсинов В и L определяли флуориметрическим методом [11] с использованием субстратов Z-Arg-Arg-MCA и Z-Phe-Arg-MCA соответственно (НПО "Вектор", Кольцово, Новосибирская обл.) и селективного ингибитора катепсина В - CA-074 в концентрации 1×10^{-4} М (предоставлен профессором N. Katunuma). Инкубацию проводили при 37° С, при pH 6,0 для катепсина В и при pH 5,5 для катепсина L. После остановки ферментативной реакции (смесью, содержащей 0,1 М монохлоруксусную кислоту и 0,1 М уксусную кислоту (pH 4,3), флуоресцирующие продукты реакции измеряли соответственно при 355 и 460 нм на

спектрофлуориметре Perkin Elmer 650-10S (Япония). Активность катепсинов В и L выражали в нмоль метилкумариламида (МКА) в мин на мг белка в тканях, и в МКА/мин на мл - в сыворотке крови. Активность прокатепсина В определяли после преинкубации образцов (разведенных в 16 раз) с пепсином согласно рекомендациям Kerpler et al. [12] и Lah [6]. Активность катепсина D измеряли спектрофотометрическим методом с использованием в качестве субстрата 2% раствора азоказеина, приготовленного на 6 М мочеvine при pH 5,0; реакцию останавливали добавлением раствора 10% трихлоруксусной кислоты. В супернатанте оценивали оптическую плотность при 366 нм [13]. Активность катепсина D выражали в условных лабораторных единицах A_{366} /мин на мг белка.

Содержание цистатина С и стефина А определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ИФА) человека (KRKA, Словения). Ранее нами показано, что цистатин С мышей дает перекрестную реакцию с антителами к человеческому цистатину С [14]. ИФА проводили сэндвич-методом, при котором к поликлональным кроличьим антителам к цистатину С, иммобилизованным на 96-луночном планшете, добавляли по 100 мкл стандартных растворов цистатина С или исследуемых образцов. После инкубации проб в течение 2 часов при 37° С несвязавшиеся компоненты удаляли трехкратным промыванием, затем добавляли по 100 мкл моноклональных антител к цистатину С, меченных пероксидазой хрена. К образовавшемуся комплексу добавляли раствор 3,3',5,5' - тетраметилбензидина, содержащего 5 мкл 33 % перекиси водорода. Цветные продукты реакции измеряли на многоканальном спектрофотометре Star 30 Plate Reader ("Kenstar". USA) при 450 нм. Результаты выражали в нмоль/л для сыворотки крови и в нмоль/г белка для гомогенатов ткани. Принцип определения содержания стефина А аналогичен.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ "STATISTIKA", используя t-тест Стьюдента (сравнимые величины считали достоверными при $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В асците, развившемся после внутрибрюшинной перевивки HA-1, наряду с опухолевыми клетками содержатся макрофаги, лимфоциты и другие клетки крови. У нелеченных животных количество асцита было максимальным на 10-12-й день после перевивки, при этом состояние мышей резко ухудшалось и еще через 6-8 дней они погибали.

Цистеиновые (катепсины В и L) и аспартильные (катепсин D) протеиназы играют важную роль в развитии различных опухолей [1, 7]. В настоящей работе показано, что асцитные клетки HA-1 гепатомы обладают большей активностью катепсина В, чем печень интактных животных (табл.1). Обнаружено, что на 10-й день развития HA-1 гепатомы в асцитных клетках активность катепсина В в 2 раза выше, чем в печени тех же мышей с опухолью (табл.1). Очевидно, в повышенные значения катепсина В вносят вклад обогащенные катепсином В макрофаги, присутствующие в общем пуле с опухолевыми клетками. Катепсин В является основной протеиназой макрофагов, его повышенная секреция свидетельствует об их активации [11, 14]. Ранее нами было показано, что в асцитных клетках HA-1 гепатомы увеличивалась активность β -гексозаминидазы - маркерного фермента макрофагов [15], что подтверждает участие макрофагов.

Активность катепсина В в печени мышей-опухоленосителей на 10-й день развития опухоли ниже по сравнению с интактными животными, а в селезенке активность фермента у тех же животных выше (табл.1). Очевидно, печень и селезенка мышей с асцитной формой HA-1 гепатомы подвергаются её токсическому воздействию.

Известно, что активность катепсина В сыворотки крови человека и мышей очень низкая из-за высокого содержания ингибиторов протеиназ [15]. В связи с тем, что в деградации субстрата для катепсина В могут участвовать и другие протеиназы (сериновые) сыворотки крови, обычно говорят о катепсин-В-подобной активности сыворотки крови. По сравнению с интактными животными катепсин

ЦИСТЕИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ И ИХ ИНГИБИТОРЫ ПРИ ГЕПАТОМЕ

Таблица 1. Активность катепсина В у мышей с НА-1 гепатомой при лечении Украинном

Группы животных	Печень	Селезенка	Асцитные клетки	Асцитная жидкость	Сыворотка
1. НА-1 гепатома, 10 суток	0,191 ± 0,024***	1,11 ± 0,05***	0,414 ± 0,02	0,294 ± 0,050	0,0132 ± 0,0029*
2. НА-1 гепатома, 10 суток + Украин (х 1)	0,236 ± 0,015	1,22 ± 0,03***	0,495 ± 0,03	0,216 ± 0,016 (10)	0,0190 ± 0,0026
3. НА-1 гепатома, 12 суток	0,342 ± 0,036	1,02 ± 0,11**	0,487 ± 0,03	0,141 ± 0,035* P ₁₋₃ <0,05	0,0171 ± 0,0036
4. НА-1 гепатома, 12 суток + Украин (х 5)	0,291 ± 0,024	1,15 ± 0,12**	0,475 ± 0,04	0,180 ± 0,048	0,0193 ± 0,0028
5. Интактные	0,348 ± 0,014	0,66 ± 0,03	-	-	0,0213 ± 0,0019

Примечание: Количество животных в группах - 8-10. Активность катепсина В в печени, селезенке и в асцитных клетках выражена в нмоль МКА/мин на мг белка; в асцитной жидкости выражена в нмоль МКА/мин на г белка; в сыворотке - в нмоль МКА/мин на мл. *Значимость различий $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с интактными мышами. Здесь и далее символы (х 1) или (х 5) показывают однократное или пятикратное введение препарата

В-подобная активность сыворотки мышей с НА-1 гепатомой снижена на 10-й день развития опухоли (табл.1). Активность катепсина В в асцитной жидкости снижается при развитии опухоли (на 12-й день) по сравнению с 10 днем (табл. 1).

Активность прокатепсина В в асцитной жидкости мышей с НА-1 гепатомой (10 суток) более чем в 1000 раз выше, чем в сыворотке крови ($5,06 \pm 0,98$ прогив $0,0032 \pm 0,001$ нмоль МКА/мин на мл, соответственно). Это свидетельствует о селективной секреции проформы катепсина В в асцитную жидкость, что имеет важное значение в процессе малигнизации [15].

Активность катепсина L в асцитных клетках была сходной с активностью фермента в печени мышей-опухоленосителей и ниже по сравнению с печенью интактных животных (10, 12-й день, табл.2). По мере роста опухоли наблюдали снижение активности катепсина L в печени ($p < 0,01$). Активность катепсина L в асцитной жидкости и сыворотке крови выше в 100 и 20 раз соответственно, чем активность катепсина В (табл.1, 2).

Таблица 2. Активность катепсина L при развитии НА-1 гепатомы и при лечении Украинном

Группы животных	Печень	Селезенка	Асцитные клетки	Асцитная жидкость	Сыворотка
1. НА-1 гепатома, 10 суток	0,078 ± 0,008*	0,105 ± 0,010***	0,077 ± 0,005	0,031 ± 0,002	0,295 ± 0,057
2. НА-1 гепатома, 10 суток + Украин х 1	0,071 ± 0,005***	0,102 ± 0,003***	0,089 ± 0,003	0,029 ± 0,002	0,429 ± 0,049
3. НА-1 гепатома, 12 суток	0,052 ± 0,007* P ₁₋₃ <0,05	0,086 ± 0,006***	0,059 ± 0,013	0,024 ± 0,002	0,272 ± 0,074
4. НА-1 гепатома, 12 суток + Украин х 5	0,049 ± 0,005** P ₁₋₄ <0,01	0,098 ± 0,013***	0,065 ± 0,003	0,020 ± 0,002	0,434 ± 0,051
5. Интактные	0,101 ± 0,004	0,047 ± 0,001	-	-	0,386 ± 0,032

Примечание: Количество животных в группах - 8-10. Активность катепсина L в печени, селезенке, асцитных клетках и в асцитной жидкости выражена в нмоль МКА/мин на мг белка; в сыворотке - в нмоль МКА/мин на мл * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с интактными мышами

К 12 дню развития опухоли активность катепсина D в асцитных клетках снижалась почти в 2 раза по сравнению с 10 днем. При этом наблюдалось увеличение его активности в асцитной жидкости. Активность катепсина D в печени и селезенке не изменялась по сравнению с интактными животными (табл.3).

Таблица 3. Активность катепсина D при развитии HA-1 гепатомы мышей и при лечении Укаином

Группы животных	Печень	Селезенка	Асцитные клетки	Асцитная жидкость
1. HA-1 гепатома, 10 суток	13,4 ± 1,6	37,7 ± 2,4	13,5 ± 1,20	8,3 ± 1,00
2. HA-1 гепатома, 10 суток + Укаин (х 1)	14,5 ± 1,60	39,1 ± 1,60	11,5 ± 0,70	15,9 ± 1,20 p ₁₋₂ <0.01
3. HA-1 гепатома, 12 суток	11,8 ± 1,4	40,6 ± 1,20	6,5 ± 1,10 P ₁₋₃ <0.01	10,6 ± 1,10 p ₁₋₃ <0.05
4. HA-1 гепатома, 12 суток + Укаин (х 5)	11,8 ± 1,2	32,2 ± 5,31	8,2 ± 1,10 P ₂₋₄ <0.05	8,2 ± 1,10
5. Интактные	13,0 ± 2,0	45,2 ± 10,1	-	-

Примечание: Количество животных в группах - 8-10. Активность катепсина D выражена в А₃₆₆ / мин на мг белка

Нами обнаружено, что рост HA-1 гепатомы сопровождается изменением содержания ингибиторов цистеиновых протеиназ. В асцитных клетках HA-1 гепатомы содержание цистатина C (внеклеточного ингибитора цистеиновых протеиназ) снижалось почти в 10 раз по сравнению с печенью интактных мышей (табл.5). Отмечалась более высокая концентрация стефина А (внутриклеточного ингибитора цистеиновых протеиназ) в клетках гепатомы, она в 4,5 раза выше, чем цистатина C (табл. 4).

Таблица 4. Содержание цистатина C и стефина А у мышей при HA-1 гепатоме

Показатели	Цистатин C, нмоль/г белка (внеклеточный ингибитор)	Стефин А, нмоль/г белка (внутриклеточный ингибитор)
1. Печень		
• интактные	0,450 ± 0,01	0,470 ± 0,046
• с HA-1 гепатомой	0,075 ± 0,01*	0,140 ± 0,05*
2. Селезенка		
• интактные	0,108 ± 0,047	0,569 ± 0,087
• с HA-1 гепатомой	0,105 ± 0,020	0,188 ± 0,051 *
3. Асцитные клетки	0,038 ± 0,005	0,170 ± 0,01
4. Асцитная жидкость ¹	0,216 ± 0,002	-
5. Сыворотка крови ¹		
• интактные	25,0 ± 0,022	5,12 ± 1,02
• с HA-1 гепатомой	8,8 ± 1,20 *	-

Примечание: Количество животных в каждой группе 8-9. ¹Содержание цистатина C и стефина А в сыворотке крови и асцитной жидкости выражено в нмоль/л. * - p < 0.05 по сравнению с интактными мышами

В печени мышей с асцитной формой HA-1 гепатомы наблюдали снижение цистатина C в 6 раз, а стефина А в 3 раза по сравнению с интактной печенью (табл.4). В селезенке не отмечалось снижения цистатина C, в то время как содержание стефина А уменьшалось в 3 раза (табл. 4). В сыворотке крови мышей с HA-1 гепатомой количество цистатина C почти в 3 раза меньше, чем в сыворотке интактных животных (табл.4).

ЦИСТЕИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ И ИХ ИНГИБИТОРЫ ПРИ ГЕПАТОМЕ

Таблица 5. Содержание цистатина С в асцитных клетках мышей при развитии НА-1 гепатомы и лечении Украином

Группы животных	Асцитные клетки	
	пмоль/г сырой ткани	пмоль/г белка
1. НА-1 гепатома, 10 дней + физ. раствор (x 1)	$4,46 \pm 0,86^*$ (8)	$35,9 \pm 5,3^*$ (8)
2. НА-1 гепатома, 10 дней + Украин (x 1)	$5,08 \pm 0,55^*$ (9)	$57,2 \pm 7,3^*$ (9) $P_{1-2} < 0,05$
2. НА-1 гепатома, 12 дней + физ. раствор (x 5)	$2,04 \pm 0,20^*$ (6)	$33,4 \pm 3,7^*$ (6)
3. НА-1 гепатома, 10 дней + Украин (x 5)	$4,07 \pm 0,32^*$ (8) $P_{3-4} < 0,001$	$52,0 \pm 6,9^*$ (8) $P_{3-4} < 0,05$
5. Печень интактных мышей	$24,94 \pm 1,68$ (8)	$450,0 \pm 10,6$ (8)

Примечание: * - $p < 0,001$ по сравнению с печенью интактных мышей

В целом, развитие мышинной НА-1 гепатомы сопровождалось увеличением активности катепсина В в асцитных клетках, повышением активности катепсина D в асцитной жидкости и обогащением асцитной жидкости прокатепсином В. Изменение активности протеиназ происходит также в органах, не вовлеченных в опухолевый рост (печени и селезенке) мышей-опухоленосителей. С другой стороны, рост опухоли сопровождался снижением содержания ингибиторов цистеиновых протеиназ - цистатина С и стефина А - как в опухолевых клетках, так и в ткани печени. Количество стефина А снижалось также и в селезенке. В сыворотке крови у мышей с асцитной гепатомой НА-1 количество цистатина С было в 3 раза ниже по сравнению с интактными мышами.

Для противоопухолевой терапии в настоящих экспериментах использовали Украин - новый полусинтетический противоопухолевый препарат, приготовленный на основе растительного сырья (чистотел, *Chelidonium majus* L.). Ранее было показано, что он обладает цитостатическим и цитолитическим действием и используется в качестве эффективного средства для лечения некоторых опухолей в эксперименте на животных и у человека [16,17]. Препарат также проявляет иммуномодулирующее и гепатопротекторное действие и наряду с интерфероном- α эффективен при лечении ряда гепатитов, в том числе хронического гепатита С у людей [18]. Механизм действия Украина до конца не изучен.

Нами показано, что под влиянием 5-кратного введения Украина мышам с гепатомой продолжительность жизни животных возросла с $20,2 \pm 1,9$ дней до $26,4 \pm 2,2$ дня ($p < 0,05$). При лечении платином продолжительность жизни мышей составила $30,0 \pm 1,8$ дней ($p < 0,01$). Ежедневный прирост массы опухоли в печени мышей составил $99 \pm 10,6$ мг/день под влиянием 5-кратного введения Украина и $68 \pm 7,5$ мг/день при лечении платином. В обоих случаях это достоверно ниже, чем в контроле ($179 \pm 19,7$).

У нелеченных животных с асцитной формой опухоли вес асцита на 10 день после перевивки составил $1,6 \pm 0,18$ г, а на 12 день - $3,7 \pm 0,61$ г. Однократное введение Украина не изменяло вес асцита, а при 5-кратном его введении количество асцита на 12 день снизилось до $2,6 \pm 0,53$ г. Масса асцитных клеток у нелеченных животных составила $20,5 \pm 3,10\%$, тогда как при повторном введении Украина масса их снижалась до $16,4 \pm 1,52\%$ ($p < 0,05$). При развитии гепатомы НА-1 в общем пуле асцитных клеток опухолевые клетки составляли 25%, лимфоциты - 28%, макрофаги - 31%. Повторные введения Украина приводили к снижению числа опухолевых клеток (10%) и лимфоцитов (7%) и увеличению

количества макрофагов (свыше 80%). Кроме того, в периферической крови при развитии асцитной опухоли НА-1 значительно увеличивалось количество нейтрофилов ($56,8 \pm 3,8\%$, контроль - $16,5 \pm 2,8\%$) и моноцитов ($2,88 \pm 1,09$, контроль - $1,63 \pm 0,56\%$), а под влиянием Украина количество моноцитов значительно снижалось ($0,57 \pm 0,3$, у нелеченных мышей - $5,25 \pm 0,62\%$).

Введение Украина (однократное или 5-кратное) не оказывало влияния на активность катепсинов В и L в клетках опухоли, а также в печени и селезенке (табл. 1, 2). Необходимо отметить увеличение активности катепсина D в асцитной жидкости мышей при росте НА-1 гепатомы и под влиянием однократного введения Украина (табл. 3). Однократное и 5-кратное введение Украина увеличивало содержание цистатина С в асцитных клетках НА-1 гепатомы в 1,6 раза (табл. 5).

Таким образом, под влиянием 5-кратного введения Украина возросла продолжительность жизни мышей с экспериментальными метастазами опухоли НА-1 в печени и снижился ежедневный прирост их массы. В случае асцитной опухоли под влиянием Украина изменялся клеточный состав асцита: количество опухолевых клеток и лимфоцитов снижалось, а количество макрофагов увеличивалось. Введение Украина (однократное или 5-кратное) не оказывало влияния на активность катепсинов В и L в клетках асцитной опухоли НА-1, но увеличивало содержание цистатина С. Возможно, противоопухолевый эффект Украина связан с повышением содержания эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ, в частности, цистатина С, что будет предметом наших будущих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Werle B., Julke B., Lah T., Kos J., Spiess E., Ebert W. (1997) In: Proteolysis in Cell Functions (Hopsu-Havu V.K. et al., eds.) IOS Press, Amsterdam et al. pp.472-478
2. Lah T.T., Kos J. (1998) Biol. Chem. **379** (2), 125-130
3. Kos J., Stabuc B., Schweiger A., Krasovec M., Cimerman N., Kopitar-Jerala N., Vrhovec I. (1997) Clin. Can. Res., **3**, 1815-1822
4. Heidtmann H.H., Salge U., Abrahamson M., Bencina M., Kastelic L., Kopitar-Jerala N., Turk V., Lah T.T. (1997) Clin.Exp.Metastasis., **15** (4), 368-381
5. Korolenko T. A., Kaledin V. I., Nikolin V.P., Djanayeva S.Ja., Svechnikova I.G., Poteryaeva O.N., Falameyeva O.V., Nowicky J.W. (2000) 5th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis.-Munich, Germany, pp. 875-879
6. Lah T.T., Calaf G., Kalman E., Shinde B.G., Somers R., Estrada S., Salero E., Russo J., Daskai I. (1996) Breast Cancer Research and Treatment., **39**, 221-233
7. Abrahamson M., Sloane B.F. (1997) In: Proteolysis in Cell Functions (Hopsu-Havu V.K. et al., eds.) IOS Press, Amsterdam et al., pp. 472-478
8. Wu G.S., Saftig P., Peters C., El-Deiry W.S. (1998) Oncogene., **16** (17), 2177-2187
9. Calkins C. C., Sloane B.F. (1995) Biol. Chem. Hoppe Seyler., **356** (2), 71-80.
10. Каледин В. И., Николлин В. П., Попова Н. А., Будкер В. Г., Семенова Л. А. (1989) Вопр. онкологии, **35** (5), 599-602
11. Barrett A. J., Kirschke H. (1981) In: Methods Enzymol., **80**, 535-561
12. Keppler D., Abrahamson M., Sordat B. (1994) Biochem. Soc.Trans., **22**, 43-49
13. Djanayeva S.Ja., Korolenko T. A., Svechnikova I.G., Falameyeva O.V., Korolenko E., Kaledin V. I., Nowicky J.W. (2000) Drugs Exper. Clin. Res., **26**, 293-300

ЦИСТЕИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ И ИХ ИНГИБИТОРЫ ПРИ ГЕПАТОМЕ

14. Poteryaeva O.N., Falameyeva O.V., Korolenko T. A., Kaledin V. I., Djanayeva S.Ja., Nowicky J.W., Sandula J. (2000) *Drugs Exper. Clin. Res.*, **26**, 301-306
15. Korolenko T. A., Svechnikova I.G., Kaledin V. I., Stashko Ju., Ilnitskaya S., Nikolin V. (1998) *Drugs Exper. Clin. Res.*, **24**, 271-276.
16. Nowicky J.W., Hiesmayr W., Nowicky W., Liepins A. (1996) *Drugs Exper. Clin. Res.*, **22**, 9 - 19.
17. Liepins A., Nowicky J.W. (1996) *Drugs Exper. Clin. Res.*, **22**, 31 - 41.
18. Voltchek I., Sologub T., Nowicky J.W., Grigoryeva T., Belozyorova L., Belopolskaya M., Semenyako N., Lamanova E. (2000) *Drugs Exper. Clin. Res.*, **26**, 261 -267.

Поступила 11.06.2001.

CYSTEINE PROTEINASES AND THEIR INHIBITORS IN MURINE HA-1 HEPATOMA DURING ANTITUMOR TREATMENT

O.N.Poteryaeva¹, T.A.Korolenko¹, I.G.Svechnikova¹, S.Ya.Zhanaeva¹, O.V.Falameyeva¹, V.I.Kaledin², J.W.Nowicky³

¹ Institute of Physiology RAMS, Institute of Biochemistry RAMS, Novosibirsk;

² Institute of Cytology and Genetics RAS, Novosibirsk;

³NowickyPharma, Austria

Development of murine HA-1 hepatoma was accompanied by increased activity of cathepsin B (in ascitic cells), cathepsin D (in ascitic fluid) and increased activity of procathepsin B. There were some changes of cysteine proteinases in liver and spleen, not involved directly into tumor growth. The most prominent changes included the decreased level of cysteine proteinase inhibitors cystatin C and stefin A in ascitic cells (and to a lesser degree in liver tissue). During tumor development serum cystatin C concentration decreased by 3-times compared to intact mice. Treatment by antitumor drug Ukrain increased life span of mice with HA-1 hepatoma (transplanted intravenously), decreased the increment of tumor weight. In ascite such treatment caused a decrease of number of tumor cells and an increase of number of macrophages. Ukrain (administered once or 5-times in a dose of 0.5 mg per mice) increased cystatin C level, revealing protective mechanism of action.

Key words: cathepsins B, L, D; cystatin C; stefin A, HA-1 hepatoma, Ukrain