

УДК 616-006.446.2
©Коллектив авторов

ЛИЗОСОМНЫЕ КАТЕПСИНЫ В, L И D ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗОВ МЫШЕЙ

Т.А. Халикова^{1}, Т.А. Короленко¹, С.И. Ильницкая²*

¹Государственное Учреждение Научно-исследовательский институт физиологии
СО РАМН, 630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4; факс: (3832)324254;
эл. почта: kotelkin@online.nsk.su

²Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск,
пр. Академика Лаврентьева, 10

Протеолитические ферменты лизосом принимают активное участие в патогенезе злокачественных заболеваний. Нарушение взаимодействия протеаз и их ингибиторов способствует инвазивному росту опухоли и ее дальнейшему метастазированию. Среди протеаз, связанных со злокачественным ростом, основными считаются цистеиновые протеазы катепсины В и L, аспартильная протеаза катепсин D. Настоящая работа посвящена исследованию активности катепсинов В, L и D при развитии и лечении экспериментальных лейкозов мышей и установлению связи данных показателей с характером течения и эффективностью терапии опухолевых процессов. Лейкоз Р-388 характеризовался более агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом по сравнению с лейкозом L1210/1. При исследовании активности протеаз лизосом у мышей с опухолью Р-388 отмечена более низкая активность катепсинов В, L и D в опухолевой ткани, печени и селезенке и катепсинов В и L в сыворотке крови, чем у животных с лейкозом L1210/1. Изменение активности катепсинов В, L и D в печени и селезенке животных при развитии лейкозов отражало агрессивность течения злокачественного процесса и степень поражения органа опухолевыми клетками. При лечении экспериментальных лейкозов происходило повышение активности катепсинов В, L и D в опухолевой ткани, печени, селезенке и повышение активности катепсинов В и L в сыворотке крови мышей, при этом наибольшая активность протеаз наблюдалась в группах животных с максимальным торможением роста опухоли. Полученные данные указывают на вовлечение протеаз лизосом в развитие экспериментальных лейкозов мышей и элиминацию опухолевых клеток при лечении. Определение активности катепсинов может быть использовано для оценки агрессивности течения злокачественного процесса, чувствительности опухоли к терапии и эффективности проводимого лечения.

Ключевые слова: цистеиновые протеазы, аспартильные протеазы, перевиваемые лейкозы, циклофосфан.

ВВЕДЕНИЕ. Развитие злокачественных новообразований является одной из интенсивно изучаемых проблем в современной науке, привлекающей внимание ученых различных специальностей. В последнее время большое значение уделяется исследованию участия протеолитических ферментов лизосом и их ингибиторов в патогенезе онкологических заболеваний [1]. Нарушение экспрессии и секреции протеаз, распределения в клетке и регуляции их активности представляет собой отличительную черту опухолевых клеток [2]. Протеазы, секретируемые

Принятые сокращения: ЦФ – циклофосфан, SE-гликан – сульфэтилированный (1→3)-β-D-гликан, ФНО – фактор некроза опухоли, ТРО – торможение роста опухоли, ПИ – печеночный индекс, СИ – селезеночный индекс, МКА – метилкумариламид.

* - адресат для переписки

опухолью, вызывают деструкцию внеклеточного матрикса (коллагена, эластина, протеогликанов) и лизис базальной мембраны, способствуя тем самым дальнейшему распространению злокачественных клеток (рис. 1). Для подавления активности протеаз усиливается экспрессия ингибиторов [3]. Однако патологическая секреция протеолитических ферментов при новообразованиях сопровождается расходом эндогенных ингибиторов и приводит к нарушению соотношения протеазы/ингибиторы протеаз, снижение последних ведет к неконтролируемому росту опухоли [4]. К тому же, в процессе развития злокачественного новообразования ряд факторов препятствует ингибированию протеолитических ферментов. Наблюдается изменение сродства катепсинов к эндогенным ингибиторам, нарушение стабильности комплекса протеазы/ингибиторы за счет снижения константы ассоциации и повышения константы диссоциации. Протеазы, секретируемые злокачественными клетками, приобретают устойчивость к ингибиторам организма. Снижается и активность самих ингибиторов, что приводит к нарушению связывания катепсинов [5]. Таким образом, дисбаланс в протеолитической системе способствует инвазивному росту опухоли и ее дальнейшему метастазированию (рис. 1). Изменение концентрации и активности протеаз и их ингибиторов может дать ценную информацию о динамике течения и прогнозе опухолевого процесса [6]. Согласно последним исследованиям, наиболее перспективными в качестве маркеров опухолевого роста и прогностических факторов при злокачественных новообразованиях являются цистеиновые протеазы катепсины В и L, их эндогенный ингибитор цистатин С и аспартильная протеаза катепсин D [3, 5]. Для ряда опухолей человека показана корреляция активности и концентрации протеаз и их ингибиторов с агрессивностью течения онкологических заболеваний, метастатическим потенциалом, риском рецидивирования и продолжительностью жизни больных [7-10].

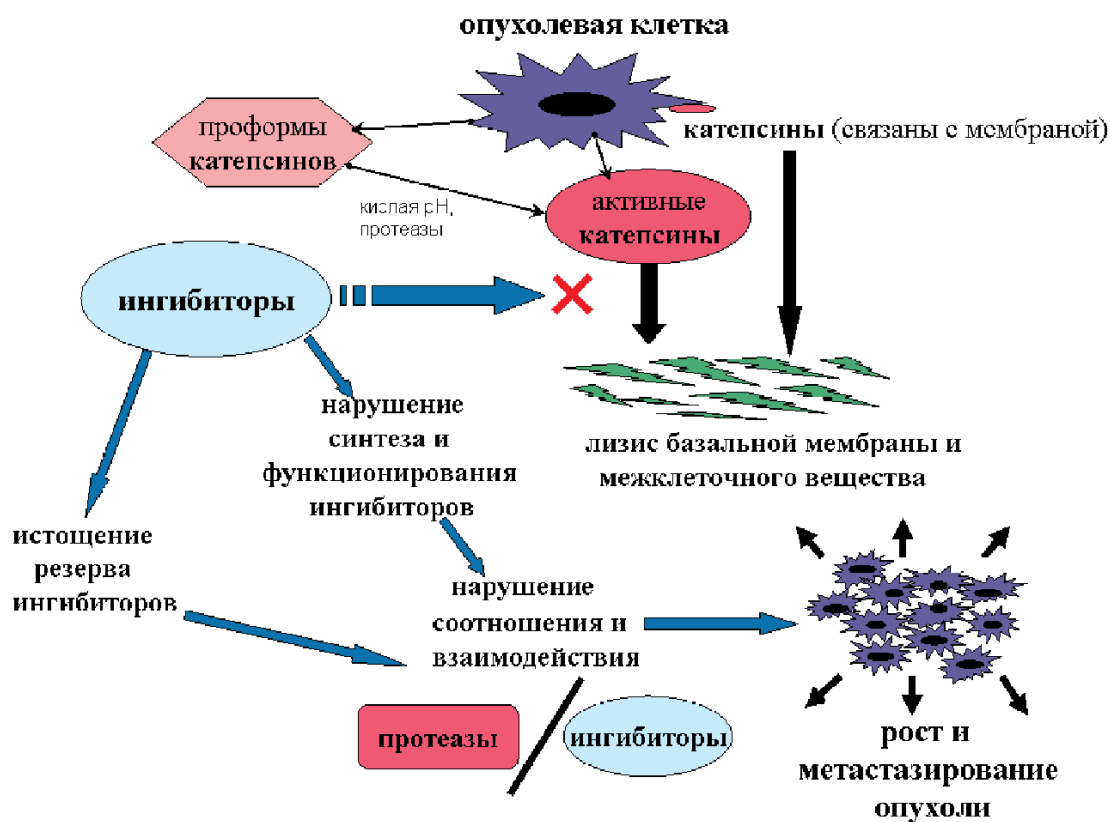


Рисунок 1.

Нарушение протеолитического баланса при развитии злокачественных опухолей.

Настоящая работа посвящена исследованию участия протеаз лизосом – катепсинов В, L и D – в развитии экспериментальных лейкозов мышей и элиминации опухолевых клеток при их лечении, а также установлению связи данных показателей с характером течения и ответом на терапию злокачественного процесса.

МЕТОДИКА.

Животные. В работе использованы 3-4-месячные мыши-самцы линии DBA/2 массой 20-22 г, полученные из Института фармакологии Томского научного центра. Животные содержали по 10 особей в пластмассовых ванночках площадью 8 дм² при естественном освещении и получали воду и экструдированный комбикорм ПК-120-1 (ООО “Комбикорм”, Москва). За 12 часов до забоя животных лишали корма, забой проводили в утренние часы (10-11 часов).

Трансплантация опухолей. Для трансплантации использовали асцитные формы мышиных лейкозов Р-388 и L1210/1. Штамм лейкоза L1210/1, отличающийся от исходного L1210 менее злокачественным течением, был получен в ИЦиГ СО РАН ранее после культивирования последнего в течение 10 пассажей *in vitro* [11]. При перевивке опухолей асцитную жидкость, содержащую опухолевые клетки, разбавляли физиологическим раствором в 20 раз и перевивали в мышцы бедра по 0,1 мл суспензии опухолевых клеток на мышшь. Число перевитых клеток составляло $1,7 \times 10^6$ на мышшь.

Препараты, использованные для лечения лейкозов мышей. **Циклофосфан** (ЦФ, АО “Биохимик”, Саранск, Россия) – алкилирующий цитостатический препарат, обладающий противоопухолевыми и иммуносупрессорными свойствами. Препарат является производным бис-(β-хлорэтил)–амин и способен индуцировать апоптоз опухолевых и нормальных клеток [12, 13]. **Сульфозетилованный (1→3) β-D-гликан** (SE-гликан, Институт химии Словацкой Академии Наук, Братислава, Словакия) получен при химической модификации (1→3) β-D-гликанов, представляющих собой высокомолекулярные полимеры глюкозы, выделенные из клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Сульфозетилирование используют для повышения их растворимости. (1→3) β-D-гликаны относятся к модификаторам биологического ответа и обладают способностью неспецифически активировать клеточный и гуморальный компоненты иммунного ответа [14].

Схемы лечения экспериментальных лейкозов мышей. Мыши с лейкозом Р-388 были случайным образом разделены на 4 группы, по 20 животных в каждой группе. SE-гликан вводили одной группе мышей в дозе 25 мг/кг на 3, 6, 9, 12 и 15 сут после трансплантации опухоли. Выбор дозы препарата определен при использовании аналогичного иммуномодулятора карбоксиметилированного (1→3) β-D-гликана в ходе лечения экспериментальных опухолей мышей [14]. На 10 день после перевивки лейкоза группам мышей, которые не получали SE-гликана, ЦФ вводили в дозах 25 и 50 мг/кг, мышам, получавшим SE-гликан – в дозе 25 мг/кг. Мыши с лейкозом L1210/1 были разделены на 3 группы, по 20 животных в группе. SE-гликан вводили одной группе животных на 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 сут, а ЦФ в дозе 40 мг/кг на 10 сут после трансплантации лейкоза этой же группе мышей и мышам, не получавшим SE-гликана. Препараты вводили внутрибрюшинно в физиологическом растворе. В качестве контроля использованы группы животных с лейкозами Р-388 и L1210/1 без лечения. Отдельно выделена группа интактных мышей. Мышей с лейкозами Р-388 и L1210/1 умерщвляли путем декапитации на 13 и 17 сут после трансплантации опухолей.

Оценка эффективности лечения. При забое животных оценивали массу печени, селезенки и опухолевого узла по разнице масс конечности с опухолью и контралатеральной конечности.

Печеночный (ПИ) и селезеночный (СИ) индексы рассчитывали по формулам:

$$\text{ПИ} = \frac{m_{\text{печень}}}{m_{\text{мышь}}} \times 100, \quad \text{СИ} = \frac{m_{\text{селезенка}}}{m_{\text{мышь}}} \times 100$$

Процент торможения роста опухоли (ТРО, %) оценивали по формуле:

$$\text{ТРО} = \frac{m_t - m_0}{m_t} \times 100,$$

где m_k и m_0 – масса опухоли в контрольной и опытной группах.

Приготовление гомогенатов тканей. Гомогенаты тканей готовили с использованием рекомендации de Duve [15]. Немедленно после декапитации мышей вскрывали брюшную полость, извлекали органы (печень, селезенку), иссекали опухолевую ткань и помещали их в холодный раствор 0,25 М сахарозы ($0 \pm 4^\circ\text{C}$). Исследуемые образцы промывали при помощи шприца 0,25 М раствором сахарозы, содержащим 1 мМ ЭДТА, pH 7,4, для освобождения ткани от крови, содержащей ингибиторы протеаз, затем гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльvehейма с тефлоновым пестиком (зазор 0,2-0,3 мм) в течение 1 мин 1200 оборотов/мин при $0 \pm 4^\circ\text{C}$. В качестве среды гомогенизации использовали холодный ($0 \pm 4^\circ\text{C}$) раствор 0,25 М сахарозы с 1 мМ ЭДТА, pH 7,4; соотношение масса ткани/объем сахарозы составляло 1:9.

Подсчет числа лейкоцитов крови и клеток костного мозга мышей. После забоя мышей выделяли бедренную кость, её костномозговой канал промывали 1 мл 5% раствора уксусной кислоты. Число клеток костного мозга и лейкоцитов крови подсчитывали в световом микроскопе при помощи камеры Горяева.

Определение активности катепсинов В, L и D. Для полного разрушения субклеточных структур и выявления общей активности ферментов гомогенаты исследуемых образцов обрабатывали неионным детергентом тритон X-100 (“Sigma”, США) в конечной концентрации 0,1% (масса/объем). Активность ферментов измеряли на линейном участке зависимости скорости ферментативной реакции от времени и концентрации белка.

Активность катепсинов В и L определяли с помощью флуоресцентного метода Барретта и Киршке [16] с использованием субстратов Z-Arg-Arg-NMCA и Z-Phe-Arg-NMCA, соответственно (НПО “Вектор”, Кольцово). Инкубационная смесь содержала 200 мкл 12,5 мкМ раствора субстрата, 100 мкл исследуемых образцов, 200 мкл 0,2 М буфера (0,22 М KH_2PO_4 /0,03 М Na_2HPO_4 /2,5 мМ ЭДТА, pH 6,0 для катепсина В и 0,21 М NaCH_3COO /0,04 М CH_3COOH /2,5 мМ ЭДТА, pH 5,5 для катепсина L). Для определения активности катепсина L в инкубационную смесь добавляли селективный ингибитор катепсина В CA-074 (L-3-транс-пропилкарбамилоксиран-2-карбонил)-L-Ile-L-Pro] (“Sigma”) в концентрации 1×10^{-9} М. После инкубации в течение 30 мин при 37°C реакцию останавливали добавлением 2 мл раствора, содержащего 0,1 М монохлоруксусной кислоты, 0,1 М NaOH и 0,1 М уксусной кислоты (pH 4,3). Флуоресцентные продукты реакции измеряли на спектрофлуориметре Perkin Elmer 650-10S (Япония) при $\lambda = 355$ нм (возбуждение) и $\lambda = 460$ нм (эмиссия). Активность катепсинов В и L выражали в нмоль метилкумариламида (МКА)/мин на 1 мг белка.

Активность катепсина D определяли спектрофотометрическим методом [17]. Инкубационная смесь содержала 50 мкл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,0 и 50 мкл исследуемого образца. Реакцию запускали добавлением субстрата – 100 мкл 2% раствора (масса/объем) азоказеина (“MP Biomedicals”, США) на 6 М растворе мочевины и останавливали 250 мкл 10% раствора (масса/объем) трихлоруксусной кислоты. После охлаждения (15 мин, $0 \pm 4^\circ\text{C}$) и центрифугирования (5 мин, $0 \pm 4^\circ\text{C}$, 10000 g, r_{cp} 4,5 см) определяли оптическую плотность супернатанта на спектрофотометре Specol 20 (“Karl Zeiss”, Германия) при $\lambda = 366$ нм. Удельную активность катепсина D выражали в условных лабораторных единицах в расчете на 1 г белка (A_{366} /мин 1 г белка).

Содержание белка в гомогенатах определяли по методу Лоури и соавт. [18] с использованием в качестве стандарта БСА ("Sigma"). Содержание белка выражали в мг/мл исследуемого образца.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили с вычислением среднего арифметического и ошибки среднего арифметического. Достоверность различий (p) рассчитывали с использованием t -критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для определения корреляционных взаимосвязей между изучаемыми показателями вычисляли коэффициент корреляции (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Особенности развития лейкозов Р-388 и L1210/1. На 5-6 сутки в месте трансплантации лейкозных клеток у мышей наблюдали рост солидной опухоли, определяемой пальпаторно. На фоне роста опухолевого узла у животных развивались лейкоцитоз, гепатоспленомегалия и происходило увеличение числа клеток костного мозга по сравнению с интактными мышами, что свидетельствовало о генерализации злокачественного процесса при первоначальной перевивке опухолевых клеток в мышцы бедра.

Лейкоз L1210/1 характеризовался менее агрессивным течением по сравнению с лейкозом Р-388. Продолжительность жизни животных с опухолью L1210/1 без лечения достигала 18-20 сут и более после перевивки злокачественных клеток, в то время как мыши с лейкозом Р-388 не доживали до 17 дня (табл. 1). При лейкозе Р-388 в результате лечения масса солидной опухоли снижалась к 13 сут и вновь увеличивалась к 17 сут после трансплантации, у животных же с лейкозом L1210/1 торможение роста опухоли происходило к 13 дню и продолжалось до 17 сут и далее; при этом некоторые мыши достигали ремиссии заболевания (табл. 1). Обращала на себя внимание различная выраженность лейкоцитоза, цитоза костного мозга и гепатоспленомегалии при развитии двух опухолей. Количество лейкоцитов в крови к 13 сут после трансплантации у мышей с опухолью Р-388 возрастало в 6,2 раза, а у животных с лейкозом L1210/1 – в 4,1 раза; число клеток костного мозга – в 2,8 и 1,8 раза, соответственно. На 13 день после трансплантации ЦФ вызывал существенное снижение числа лейкоцитов и клеток костного мозга и в той, и другой опухоли. Через 17 сут после перевивки лейкозов у леченых мышей с опухолью Р-388 данные показатели вновь повышались, в то время как у мышей с лейкозом L1210/1 они практически не отличались от уровня интактных животных. И, наконец, печень и селезенка мышей увеличивались в разной степени: в 4,0 и 13,6 раз соответственно при развитии лейкоза Р-388 и всего лишь в 1,9 и 2,9 раза при лейкозе L1210/1 (табл. 1).

Активность катепсинов В, L и D в печени и селезенке у мышей с лейкозами Р-388 и L1210/1. При развитии лейкоза Р-388 к 13 сут после трансплантации активность катепсина В в печени увеличивалась и превышала таковую у интактных в 1,5 раза. В селезенке активность катепсина В, напротив, снижалась (в 1,6 раза по сравнению с интактными) (рис. 2). Активность катепсина L возрастала в печени (в 2,0 раза), но при этом снижалась в селезенке (в 1,9 раза) по сравнению со здоровыми животными (рис. 2). При исследовании катепсина D в печени выявлено постепенное повышение его активности, практически трехкратное к 13 сут после трансплантации опухоли. В противоположность этому, в селезенке активность катепсина D снижалась в 1,4 раза (рис. 2). При развитии лейкоза L1210/1, характеризовавшегося значительно менее выраженной гепатоспленомегалией, активность катепсинов В, L и D в печени не отличалась от показателей интактных животных на 13 сут после перевивки опухоли. В селезенке снижалась активность катепсина L в 1,4 раза по сравнению со здоровыми животными (рис. 2). Эффективное лечение мышей приводило к повышению активности катепсинов В (в 1,2-2,2 раза), L (в 1,3-3,4 раза) и D (в 2,3-3,6 раза) в печени и селезенке по сравнению с интактными и животными без лечения, что сопровождалось уменьшением выраженности гепатоспленомегалии.

ЛИЗОСОМНЫЕ КАТЕПСИНЫ В, L, И D ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЛЕЙКОЗЕ

Таблица 1. Особенности развития лейкозов Р-388 и L1210/1.

Показатель		Лейкоз Р-388	Лейкоз L1210/1	Интактные
Продолжительность жизни после трансплантации лейкоза		13-15 сут	20 сут и более	
Масса опухоли, г (ТРО, %)	1). Без лечения, 13 сут	2,02±0,620 (21,8 %)	3,65±0,251	
	2). После лечения, 13 сут	1,58 ± 0,251 (21,8 %)	2,91±0,160 (20,3%) $p_{1-2} < 0,05$	
	3). После лечения, 17 сут	3,21 ± 0,221 $p_{2-3} < 0,01$	0,53±0,066 (85,5%) $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,001$	
Лейкоциты, $10^9/л$	1). Без лечения, 13 сут	85,4±12,28**	56,0±7,45***	13,7±1,42
	2). После лечения, 13 сут	5,9±2,40* $p_{1-2} < 0,05$	4,5±0,31*** $p_{1-2} < 0,001$	
	3). После лечения, 17 сут	33,0±1,94*** $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$	19,1±1,50* $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,001$	
Клетки костного мозга, $10^6/бедро$	1). Без лечения, 13 сут	13,6±2,63*	8,6±0,76*	4,8±0,99
	2). После лечения, 13 сут	3,1±0,51 $p_{1-2} < 0,05$	5,4±0,81 $p_{1-2} < 0,05$	
	3). После лечения, 17 сут	12,3±0,68* $p_{2-3} < 0,05$	6,5±0,60	
ПИ, % (без лечения, 13 сут)		11,5±0,92**	5,4±0,52**	2,7±0,12
СИ, % (без лечения, 13 сут)		4,50±0,025***	0,94±0,094**	0,33±0,071

Примечание. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с интактными. Число животных в группах 7-10. ТРО - торможение роста опухоли в процентах. ПИ (печеночный индекс), СИ (селезеночный индекс) - масса печени и селезенки в процентах по отношению к массе тела.

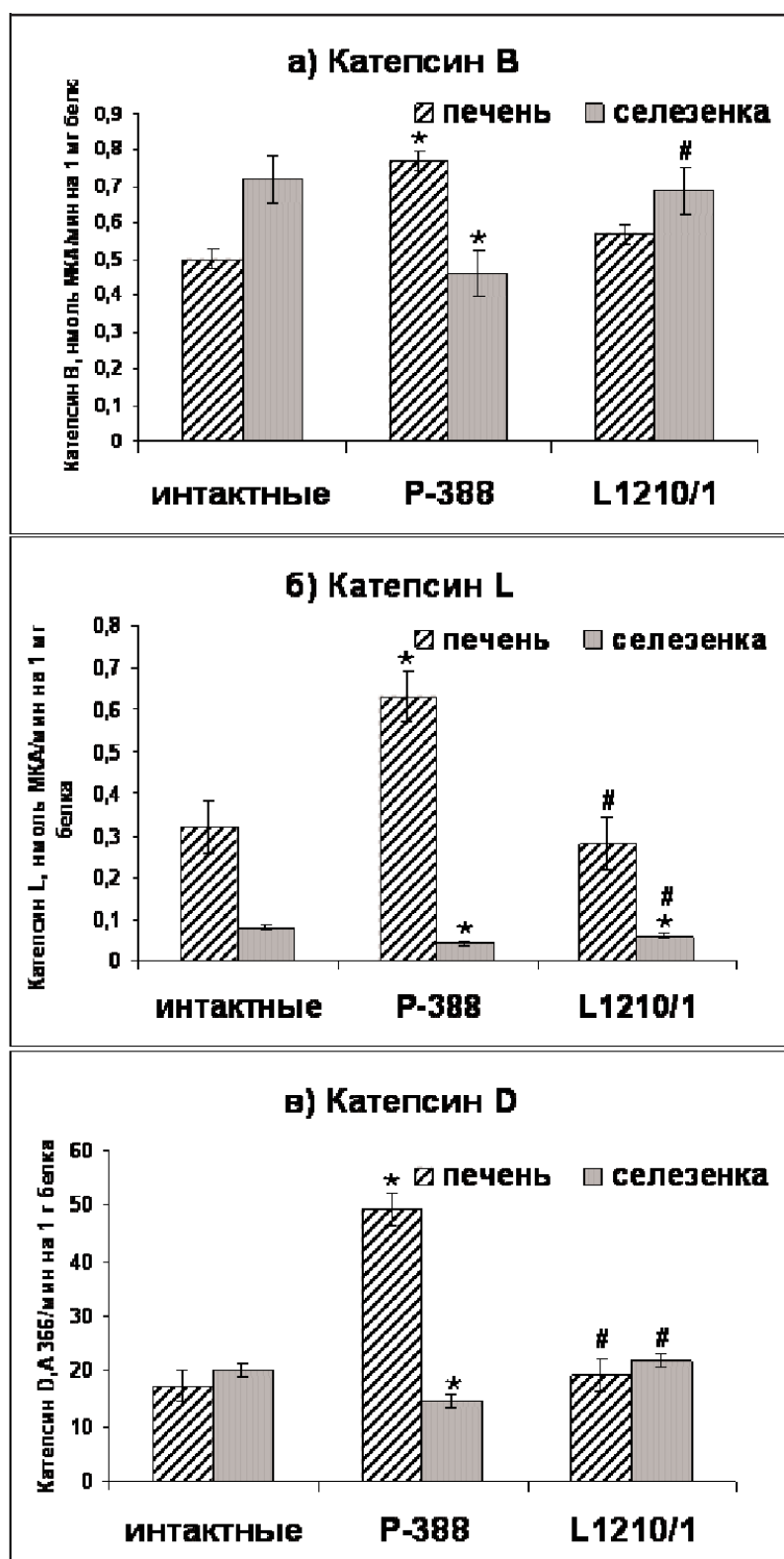


Рисунок 2.

Активность катепсинов В, L и D в печени и селезенке мышей с лейкозами P-388 и L1210/1:

а) катепсин В; б) катепсин L; в) катепсин D.

Число животных в каждой группе 7-10; мышей забивали на 13 сут. после трансплантации опухолей.

* $p < 0,05$ по сравнению с интактными мышами; # $p < 0,05$ по сравнению с мышами с лейкозом P-388.

ЛИЗОСОМНЫЕ КАТЕПСИНЫ В, L, И D ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЛЕЙКОЗЕ

Катепсин В- и L-подобная активность сыворотки крови мышей с лейкозами Р-388 и L1210/1. На 13 сут после трансплантации опухоли у мышей с лейкозом Р-388 катепсин В-подобная активность сыворотки крови не отличалась от таковой у интактных животных. Катепсин L-подобная активность, напротив, снижалась более чем в 4 раза по сравнению с исходной (рис. 3). При исследовании сыворотки крови мышей с лейкозом L1210/1 обнаружено повышение катепсин В-подобной активности и снижение катепсин L-подобной активности на 13 день после перевивки опухоли. Следует отметить, что у нелеченных животных с лейкозом L1210/1 активность катепсина В была в 1,4 раза, а катепсина L – в 2,0 раза выше, чем при лейкозе Р-388 (рис. 3). В результате лечения мышей с лейкозами катепсин В-подобная активность сыворотки крови увеличивалась на 17 сут после трансплантации опухолевых клеток (7 сут после лечения) по сравнению с интактными и животными без лечения, при этом показатель при лейкозе Р-388 оставался в 1,7 раза ниже, чем при лейкозе L1210/1. Катепсин L-подобная активность возрастала при лечении лейкозов на 13 и 17 сут после перевивки опухолей (3 и 7 сут после лечения) по сравнению с мышами без лечения, но уровня интактных животных не достигала (рис. 3).

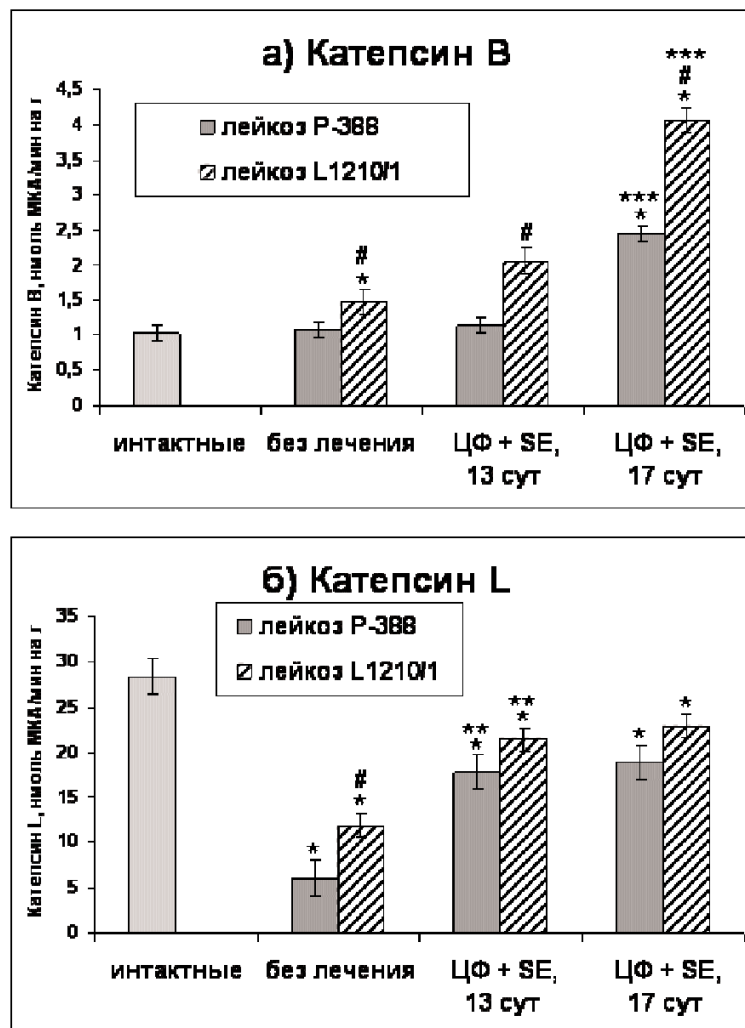


Рисунок 3.

Катепсин В- и L-подобная активность сыворотки крови мышей с лейкозами Р-388 и L1210/1: а) катепсин В; б) катепсин L. Число животных в каждой группе 7-10; мышей забивали на 13 и 17 сут после трансплантации опухолей. * $p < 0,05$ по сравнению с интактными мышами; ** $p < 0,05$ по сравнению с мышами без лечения; *** $p < 0,05$ по сравнению с группой ЦФ + SE, 13 сут.; # $p < 0,05$ по сравнению с мышами с лейкозом Р-388.

Активность катепсинов В, L и D в опухолевой ткани у мышей с лейкозами Р-388 и L1210/1. Опухолевая ткань мышей с лейкозами Р-388 и L1210/1 характеризовалась низкой активностью катепсинов В, L и D по сравнению с печенью и селезенкой интактных животных и мышей с опухолью (табл. 2, 3). При лейкозе Р-388, протекающем более злокачественно, активность катепсина L была в 1,5 раза ниже, а катепсина D – в 2,3 раза ниже по сравнению с опухолью L1210/1, отличающейся менее агрессивным течением (табл. 2, 3). У мышей с лейкозом Р-388 в результате лечения на 13 день после перевивки злокачественных клеток торможение роста опухоли составило 11,4% в группе “ЦФ 25 мг/кг”, 21,8% в группе “ЦФ 50 мг/кг” и 53,0% в группе “ЦФ 25 мг/кг + SE-гликан”. Снижение массы опухоли сопровождалось уменьшением лейкоцитоза, цитоза костного мозга, выраженности гепатоспленомегалии. При использовании всех схем лечения активность катепсинов В, L и D значительно повышалась по сравнению с животными без лечения, причем наибольшая активность катепсинов В и L наблюдалась в группе “ЦФ 25 мг/кг + SE-гликан” (табл. 2), что совпадало с максимальным торможением роста опухоли у этих животных. На 17 сут после трансплантации лейкоза Р-388 у мышей, получавших лечение, наблюдался повторный рост опухолевого узла (в 2,7 раза в группе “ЦФ 25 мг/кг”, 1,5 раза в группе “ЦФ 50 мг/кг” и 3,4 раза в группе “ЦФ 25 мг/кг + SE-гликан”), а также увеличение числа лейкоцитов в крови, цитоза костного мозга, массы печени и селезенки по сравнению с 13 сут после перевивки опухоли. При исследовании протеаз лизосом в опухолевой ткани показано, что на 17 сут после инокуляции лейкозных клеток активность катепсинов В и L заметно снижалась в группе “ЦФ 25 мг/кг” и незначительно в группе “ЦФ 25 мг/кг + SE-гликан”, оставаясь неизменной при использовании ЦФ в дозе 50 мг/кг по сравнению с 13 днем. Активность катепсина D снижалась на 17 день при схеме “ЦФ 25 мг/кг” (табл. 2). Таким образом, повторный рост опухоли у мышей с лейкозом Р-388 сопровождался уменьшением активности протеаз лизосом в опухолевой ткани.

Таблица 2. Активность катепсинов В, L и D в опухолевой ткани у мышей с лейкозом Р-388.

№	Группы животных	Катепсин В, нмоль МКА/мин на 1 мг белка	Катепсин L, нмоль МКА/мин на 1 мг белка	Катепсин D, А ₃₆₆ /мин на 1 г белка
1	Без лечения (13 сут)	0,16 ± 0,040	0,039 ± 0,0044	5,0 ± 0,88
2	ЦФ 25 мг/кг (13 сут)	0,50 ± 0,057 p ₁₋₂ < 0,001	0,096 ± 0,0072 p ₁₋₂ < 0,001	8,7 ± 0,87 p ₁₋₂ < 0,05
3	ЦФ 50 мг/кг (13 сут)	0,51 ± 0,159 p ₁₋₃ < 0,05	0,112 ± 0,0251 p ₁₋₃ < 0,05	8,9 ± 0,77 p ₁₋₃ < 0,05
4	ЦФ 25 мг/кг + SE-гликан (13 сут)	0,74 ± 0,061 p ₁₋₄ < 0,001 p ₂₋₄ < 0,05	0,131 ± 0,0090 p ₁₋₄ < 0,01 p ₂₋₄ < 0,05	8,8 ± 0,48 p ₁₋₄ < 0,01
5	ЦФ 25 мг/кг (17 сут)	0,081 ± 0,026 p ₂₋₅ < 0,001	0,049 ± 0,0043 p ₂₋₅ < 0,05	4,5 ± 0,84 p ₂₋₅ < 0,05
6	ЦФ 50 мг/кг (17 сут)	0,54 ± 0,059 p ₅₋₆ < 0,001	0,084 ± 0,0085 p ₅₋₆ < 0,05	9,8 ± 0,88 p ₅₋₆ < 0,05
7	ЦФ 25 мг/кг + SE-гликан (17 сут)	0,37 ± 0,052 p ₄₋₇ < 0,01 p ₅₋₇ < 0,001	0,067 ± 0,0041 p ₄₋₇ < 0,01 p ₅₋₇ < 0,05	9,1 ± 0,79 p ₅₋₇ < 0,01

Примечание. Число животных в группах 7-10. Сульфозетилованный (1→3)-β-D-гликан (SE-гликан) вводили на 3, 6, 9, 12 и 15 сут после трансплантации опухоли. Циклофосфан (ЦФ) вводили на 10 сут. после трансплантации опухоли. В скобках - сут. после трансплантации опухоли.

Таблица 3. Активность катепсинов В, L и D в опухолевой ткани у мышей с лейкозом L1210/1.

№	Группы животных	Катепсин В, нмоль МКА/мин на мг белка	Катепсин L, нмоль МКА/мин на мг белка	Катепсин D, А ₃₀₀ /мин на г белка
1	Без лечения (13 сут)	0,22 ± 0,041	0,058 ± 0,0050	11,4 ± 1,80
2	ЦФ 40 мг/кг (13 сут)	0,31 ± 0,061	0,078 ± 0,0127	19,4 ± 3,84
3	ЦФ 40 мг/кг + SE-гликан (13 сут)	1,17 ± 0,254 p ₁₋₃ < 0,05 p ₂₋₃ < 0,05	0,199 ± 0,0693	45,1 ± 5,35 p ₁₋₃ < 0,01 p ₂₋₃ < 0,01
4	Без лечения (17 сут)	0,19 ± 0,015	0,101 ± 0,0258	20,5 ± 5,49
5	ЦФ 40 мг/кг (17 сут)	1,11 ± 0,322 p ₂₋₅ < 0,05 p ₄₋₅ < 0,01	0,222 ± 0,0632	27,4 ± 4,90
6	ЦФ 40 мг/кг + SE-гликан (17 сут)	2,28 ± 0,227 p ₃₋₆ < 0,05 p ₄₋₆ < 0,01 p ₅₋₆ < 0,05	0,481 ± 0,0522 p ₃₋₆ < 0,01 p ₄₋₆ < 0,01 p ₅₋₆ < 0,05	42,4 ± 4,54 p ₄₋₆ < 0,05

Примечание. Число животных в группах 7-10. Сульфоетилированный (1→3)-β-D-гликан (SE-гликан) вводили на 3, 6, 9, 12, 15, 18 и 21 сут после трансплантации опухоли. Циклофосфан (ЦФ) вводили на 10 сут. после трансплантации опухоли. В скобках - сут. после трансплантации опухоли.

В отличие от лейкоза Р-388 у мышей с лейкозом L1210/1 в результате лечения снижение массы опухоли, лейкоцитоза, цитоза костного мозга, гепатоспленомегалии происходило к 13 сут и продолжалось до 17 сут после трансплантации опухоли и далее; при этом некоторые животные достигали ремиссии заболевания. Наиболее эффективной оказалась схема “ЦФ 40 мг/кг + SE-гликан”: торможение роста опухоли составило 20,3% на 13 сут и 91,1% на 17 сут после перевивки лейкоза L1210/1. В группе “ЦФ 40 мг/кг” масса опухоли снижалась незначительно (2,5%) на 13 день и в большей степени (84,0%) на 17 день после трансплантации опухоли. На фоне лечения мышей с лейкозом L1210/1 происходило повышение активности исследуемых катепсинов в опухолевой ткани (табл. 3). Применение ЦФ в дозе 40 мг/кг не влияло на активность протеаз лизосом на 13 сут и вызывало увеличение активности катепсина В на 17 сут после перевивки опухоли. У мышей, получавших лечение по схеме “ЦФ 40 мг/кг + SE-гликан”, наблюдалось достоверное повышение активности катепсинов В и D в опухолевой ткани на 13 и 17 дни и активности катепсина L на 17 день после трансплантации лейкоза (табл. 3). Обращает на себя внимание тот факт, что на 17 сут после перевивки опухоли L1210/1 при лечении активность катепсинов В и L возрастала, а катепсина D не менялась по сравнению с 13 днем (табл. 3), что сопровождалось дальнейшим торможением роста опухоли.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В настоящее время активно исследуется участие протеаз лизосом в процессах развития злокачественных новообразований с целью поиска новых диагностических и прогностических маркеров опухолевого роста [19]. Дисбаланс протеолитической системы, включающий усиление секреции проформ и зрелых протеаз [4], изменение их стабильности, нарушение их взаимодействия с ингибиторами, связь катепсинов с мембраной

злокачественных клеток [3], является неотъемлемой чертой развития опухолей, а исследование протеаз и их ингибиторов может давать ценную информацию о течении онкологического процесса [8]. Изучению данной проблемы посвящены многие экспериментальные и клинические работы. Результаты исследования активности и концентрации катепсинов и их эндогенных ингибиторов в ткани опухолей молочной железы [20], легких [9], мозга [7], желудочно-кишечного тракта [5, 10], в сыворотке крови пациентов с меланомой [6], опухолями яичников [21], прямой кишки [5] свидетельствуют о том, что данные показатели имеют большое значение для прогнозирования выживаемости, оценки риска рецидивов и смертности онкологических больных. При развитии опухолей мышей (НA-1 гепатомы, аденокарциномы легких Льюс) наблюдается изменение активности катепсинов В, L и D и концентрации эндогенных ингибиторов цистатинов А и С, нарушение соотношения протеазы/ингибиторы протеаз в злокачественной ткани, печени, селезенке, сыворотке крови. Эти показатели имеют значение для определения эффективности терапии опухолей [22].

Однако данные литературы по этой теме часто являются неполными, четкими для одного вида опухолей, но противоречивыми для другого. Неясным остается участие протеаз лизосом и их ингибиторов в динамике лечения опухолевого процесса, в результате чего не складывается четкого представления об их роли при злокачественном росте. Не выяснена зависимость активности протеаз от гистологического типа опухоли. В настоящей работе использование экспериментальных моделей лейкозов позволило оценить активность протеаз лизосом в опухолевой ткани, печени, селезенке, проследить изменение этих показателей в динамике опухолевого роста и в процессе лечения.

В нашем исследовании при трансплантации экспериментальных лейкозов в мышцы бедра наблюдался рост солидной опухоли, а также лейкоцитоз, увеличение числа клеток костного мозга и гепатоспленомегалия, что свидетельствовало о генерализации процесса. Лейкоз Р-388 характеризовался более агрессивным развитием по сравнению с лейкозом L1210/1 (табл. 1). На фоне гепатоспленомегалии у мышей с лейкозами происходило изменение активности катепсинов В, L и D в печени и селезенке, подтверждающее вовлечение этих органов в злокачественный процесс. При лейкозе Р-388 активность исследуемых протеаз в печени повышалась, а в селезенке падала (рис. 2). Следует также отметить, что активность катепсинов В, L и D в солидной опухоли у мышей с лейкозами была значительно ниже по сравнению с таковой в печени и селезенке здоровых животных. Поскольку размеры селезенки увеличивались гораздо в большей степени по сравнению с печенью (табл. 1), снижение активности катепсинов в селезенке при развитии лейкоза Р-388 можно объяснить тотальной инфильтрацией ее ткани опухолевыми клетками. С другой стороны, при развитии лейкоза L1210/1, характеризующегося более доброкачественным течением и в меньшей степени выраженной гепатоспленомегалией чем опухоль Р-388 (табл. 1), активность катепсинов В, L и D в печени не изменялась по сравнению с интактными, а в селезенке уменьшалась лишь активность катепсина L (рис. 2). Следовательно, снижение активности протеаз лизосом во внутренних органах при злокачественном новообразовании служит неблагоприятным признаком и свидетельствует об их поражении опухолевым процессом. При исследовании сыворотки крови мышей более низкая катепсин В- и L-подобная активность также была характерна для агрессивной опухоли, лейкоза Р-388, по сравнению с лейкозом L1210/1 (рис. 3). И, наконец, в опухолевой ткани мышей с лейкозом Р-388 мы выявили более низкую активность катепсинов L и D, чем в опухоли L1210/1 (табл. 2,3). Таким образом, низкая активность катепсинов В, L и D отражает более тяжелое и агрессивное течение злокачественного процесса и неблагоприятный прогноз заболевания. С этим согласуются результаты, полученные в нашей лаборатории при исследовании других экспериментальных опухолей мышей – чувствительного и резистентного к терапии ЦФ вариантов

лимфосаркомы LS. По сравнению с чувствительным, резистентный вариант опухоли характеризовался более низкой активностью катепсинов В, L и D в опухолевой ткани. Возможно, сниженная активность цистеиновых и аспартильных протеаз в резистентной лимфосаркоме ответственна за ее более злокачественное течение и невосприимчивость к дозе цитостатика, эффективной при лечении чувствительной опухоли [23, 24].

При эффективной терапии экспериментальных лейкозов мышей происходило повышение активности катепсинов в опухолевой ткани (табл. 2,3), печени, селезенке, сыворотке крови (рис. 3), причем в большей степени при лейкозе L1210/1. Следует отметить, что в опухолевой ткани наибольшая активность катепсинов В, L и D наблюдалась в группах мышей с максимальным торможением роста опухоли.

На противоопухолевую терапию мыши с лейкозами отвечали по-разному. У животных с лейкозом Р-388 солидная опухоль незначительно уменьшалась на 3 день после введения ЦФ и вновь начинала расти к 7 сут, в то время как у животных с L1210/1 масса опухоли снижалась к 3 суткам и продолжала регрессировать на 7 день (табл. 1). Описанные различия нашли отражение в активности исследуемых ферментов. Опухоль L1210/1 характеризовалась более значительным повышением активности катепсинов В и D на 3 день после лечения по сравнению с лейкозом Р-388, причем наибольшее отличие наблюдалось для катепсина D. На 7 день после введения ЦФ у мышей с лейкозом L1210/1 активность катепсинов В и L продолжала расти, а катепсина D не менялась по сравнению с 3 днем, тем самым, возможно, обуславливая дальнейшее торможение роста опухоли, имеющее место в данном случае. В противоположность этому, активность катепсинов В, L и D в опухолевой ткани Р-388 падала к 7 дню после введения препаратов, что сопровождалось повторным увеличением массы опухолевого узла (табл. 2, 3). Таким образом, можно предположить участие катепсинов В, L и D в процессах элиминации злокачественных клеток, что подтверждает возможность их использования в качестве маркеров эффективности терапии опухолей.

На основании полученных результатов, можно заключить, что высокая активность протеаз лизосом в печени, а также повышение их активности в опухолевой ткани при лечении лейкозов имеет положительное значение. Это противоречит литературным данным, полученным при исследовании различных опухолей человека (рака молочной железы [20], легких [9], мозга [7], желудочно-кишечного тракта [5, 10], меланомы [6] и др.), согласно которым высокая активность катепсинов В, L и D коррелирует с инвазивностью, метастатическим потенциалом опухоли, высоким риском развития рецидивов [6, 8, 20]. Однако в литературе не оценивается изменение активности протеаз в динамике неопластического процесса и после проведения терапии, к тому же, имеют значение видовые различия и особенности развития опухолей человека и лейкозов мышей.

Экспериментальные данные настоящей работы подтверждаются результатами, полученными при клиническом исследовании в нашей лаборатории, согласно которым у больных острым лейкозом, неходжкинской лимфомой и поздними стадиями лимфогранулематоза происходило снижение катепсин В- и L-подобной активности в крови, после проведения полихимиотерапии и достижения ремиссии заболевания активность катепсинов нормализовывалась. Кроме того, больные с агрессивными вариантами гемобластозов, более поздними стадиями процесса, тяжелым течением болезни имели более низкие значения катепсин В- и L-подобной активности сыворотки крови. У пациентов с неблагоприятным прогнозом заболевания, резистентными к проводимому лечению, активность катепсинов В и L в крови также была ниже по сравнению с больными, достигшими ремиссии в результате полихимиотерапии [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Подводя итог нашей работе, следует отметить, что при развитии экспериментальных лейкозов мышей происходит изменение активности катепсинов В, L и D в печени и селезенке животных, отражающее агрессивность

течения злокачественного процесса и степень поражения органа опухолевыми клетками. Для лейкоза L1210/1, имеющего более доброкачественное течение по сравнению с лейкозом P-388, характерна более высокая активность исследуемых катепсинов В, L и D в опухолевой ткани, сыворотке крови, печени и селезенке, чем у животных с лейкозом P-388. При лечении лейкозов наблюдается повышение активности катепсинов В, L и D в опухолевой ткани, печени, селезенке и повышение активности катепсинов В и L в сыворотке крови мышей, зависимое от эффективности терапии. Полученные данные указывают на вовлечение протеаз лизосом в развитие злокачественных новообразований и элиминацию опухолевых клеток при лечении. Определение активности катепсинов может быть использовано для оценки агрессивности течения злокачественного процесса, чувствительности опухоли к терапии и эффективности проводимого лечения.

Авторы выражают благодарность в.н.с. Института цитологии и генетики СО РАН В.И. Каледину за помощь в работе и ценные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Turk V., Kos J., Turk B. (2004) *Cancer Cell*, **5**, 409-410.
2. Lah T., Kalman E., Najjar D., Gorodetsky E., Brennan P., Somers R., Daskal I. (2000) *Hum. Pathol.*, **31**(2), 149-160.
3. Strojjan P., Svetic B., Smid L., Kos J. (2004) *Clin. Chim. Acta*, **344**, 155-161.
4. Sloane J.A., Hollander W., Moss M.B., Rosene D.L., Abraham C.R. (1999) *Neurobiol. Aging*, **20**(4), 395-405.
5. Kos J., Krasovec M., Cimerman N., Nielsen H.J., Christensen I.J., Brunner N. (2000) *Clin. Cancer Res.*, **6**, 505-511.
6. Kos J., Stabuc B., Schweiger A., Krasovec M., Cimerman N., Kopitar-Jerala N., Vrhovec I. (1997) *Clin. Cancer Res.*, **3**, 1815-1822.
7. Berquin I.M., Sloane B.F. (1996) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **389**, 281-294.
8. Strojnik T., Zajk I., Bervar A., Zidanik B., Golouh R., Kos J., Dolenc C., Lah T. (2000) *Pflugers Arch.*, **439**, 122-123.
9. Schweiger A., Staib A., Werle B., Krasovec M., Lah T.T., Ebert W., Turk V., Kos J. (2000) *Br. J. Cancer*, **82**(4), 782-788.
10. Russo A., Bazan V., Migliavacca M., Zanna I., Tubiolo C., Tumminello F.M., Dardanoni G., Cajozzo M., Bazan P., Modica G., Lattery M., Tomasino R.M., Colucci G., Gebbia N., Leto G. (2000) *Clin. Cancer Res.*, **6**(1), 178-184.
11. Каледин В.И., Николин В.П., Семенова Л.А., Годовиков А.А. (1991) *Эксперим. онкол.*, **13**, 43-44.
12. Vaux K.K., Kahole N.C., Jones K.L. (2003) *Birth Defects Res.*, **67**(6), 403-408.
13. Hamano Y., Sugimoto H., Soubasakos M.A., Kieran M., Olsen B.R., Lawler J., Sudhakar A., Kalluri R. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 1570-1574.
14. Kogan G., Sandula J., Korolenko T., Falameeva O., Poteryaeva O., Zhanaeva S., Levina O., Filatova T., Kaledin V. (2002) *Int. Immunopharmacol.*, **2**, 775-781.
15. De Duve C. (1963) in *Giba foundation symposium on lysosomes* (de Reuck A.V., Cameron M.P., eds.), Churchill, London, pp. 1-31.
16. Kirschke H., Wiederanders B. (1987) *Acta Histochem.*, **82**(1), 2-4.
17. Wiederanders B., Oelke B. (1984) *Mech. Ageing Dev.*, **24**(3), 265-271.
18. Lowry O., Rosebrough H., Farr A., Randall R. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
19. Koblinski J.E., Ahram M., Sloane B.F. (2000) *Clin. Chim. Acta*, **291**, 113-135.
20. Lah T.T., Blejec A., Kos J., Gorodetsky E., Somers R., Daskal I. (2000) *Clin. Cancer Res.*, **6**, 578-584.
21. Kastelic L., Turk B., Kopitar-Jerala N., Stolf A., Rainer S., Turk V., Lah T.T. (1994) *Cancer Lett.*, **82**(1), 81-88.
22. Фаламеева О.В., Короленко Т.А., Жанаева С.Я., Каледин В.И. (2001) *Бюллетень Сибирского Отделения РАМН*, №1, 37-40.

ЛИЗОСОМНЫЕ КАТЕПСИНЫ В, L, И D ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЛЕЙКОЗЕ

23. Усова Т.А., Жанаева С.Я., Шандула И., Коган Г., Короленко Т.А. (2003) Бюлл. exper. биол. мед., **136**, 509-512.
24. Khalikova T.A., Zhanaeva S.Ya., Korolenko T.A., Kaledin V.I., Kogan G. (2004) Cancer Letters, **223**, 1-7.
25. Халикова Т.А., Потеряева О.Н., Поспелова Т.И., Короленко Т.А. (2004) Гематол. трансфузиол., **49**(4), 18-22.

Поступила: 18. 06. 2007.

THE LYSOSOMAL CATHEPSINS B, L AND D IN DEVELOPMENT OF MURINE EXPERIMENTAL LEUKEMIAS

T.A. Khalikova¹, T.A. Korolenko¹, S.I. Ilitskaya²

¹Research Institute of Physiology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Timakov street 4, Novosibirsk, 630117 Russia; fax: (3832)324254; e-mail: kotelkin@online.nsk.su

²Research Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Lavrentjev prospect 10, Novosibirsk, 630090 Russia

Lysosomal proteases are actively involved in pathogenesis of cancer progression. Alterations in proteases and their inhibitors interaction were suggested to be implicated in the processes of tumor invasion and metastasis. Among proteases connected with malignant growth, cysteine cathepsins B and L and aspartic cathepsin D play the main role in the tumor development. The present study was designed to investigate activity of cathepsins B, L and D activity in the development and treatment of murine experimental leukemias and to determine the correlation of these proteases with tumor malignancy and the chemotherapy effect. P-388 leukemia was characterized by a more aggressive development and unfavorable prognosis than L1210/1 leukemia. The activity of cathepsins B, L and D in tumor tissues of mice infected with P-388 leukemia, as well as in liver and spleen and the activity of cathepsins B and L in serum were lower than their activity in mice infected with L1210/1 leukemia. Changes of cathepsin activity in liver and spleen of mice with leukemias have demonstrated a level of aggressiveness of tumor development and invasion of liver and spleen by neoplastic cells. The treatment resulted in the increase of cathepsin B, L and D activities in tumor tissue, liver, spleen and cathepsin B and L activities in serum. The highest activity of proteases was revealed in the groups of mice characterized by the greatest suppression of tumor growth. These data have shown that lysosomal proteases are involved in progression of murine experimental leukemias and elimination of tumor cells in the result of treatment. Determination of the activity of cysteine and aspartic proteases can be used for evaluation of cancer diseases malignancy, their sensitivity for chemotherapy and efficiency of treatment.

Key words: cysteine proteases, aspartic proteases, transplanted leukemias, cyclophosphamide.