

ТОМ 37

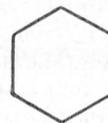
ВЫПУСК 6

НОЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. А. ТУТЕЛЬЯН (зам. редактора), А. И. АРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,
Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. П. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАР-
СКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,
Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАПЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,
Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)	ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)	ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)	ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)	ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Санкт-Петербург)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)	ЯСЛАЙТИС А. А. (Вильнюс)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)	



МАТЕРИАЛЫ ВСЕСОЮЗНОГО СИМПОЗИУМА «БИОХИМИЯ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКИ», МИНСК, НОЯБРЬ 1990 Г.

© И. Б. ЗБАРСКИЙ, 1991

УДК 616-006-018.1:576.315

И. Б. Збарский

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА ОПУХО- ЛЕВЫХ КЛЕТОК

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова АН СССР,
Москва

Несмотря на многообразие злокачественных опухолей различного гистогенеза и локализации, их клеточным ядрам свойственны многие общие черты [7]. Клеточные ядра опухолевых клеток во многом отличаются от ядер клеток в норме. Неоднородность размеров и формы клеточных ядер служат главным критерием патогистологической диагностики злокачественных опухолей. Морфологически ядра опухолевых клеток крупнее нормальных, характеризуются неправильной формой, изгибами и выпячиваниями ядерной оболочки.

Геном опухолевой и нормальной клетки, локализованный в ядре, содержит группу генов, обуславливающих неограниченное деление клеток и их малигнизацию. Эти гены, называемые онкогенами, в опухолевых клетках транскрибируются намного активнее, чем в норме, и нередко несколько отличаются от своих нормальных прототипов.

Онкогены подразделяются на иммортализирующие и малигнизующие клетку [17]. Белковые продукты малигнизующих онкогенов часто являются протеинкиназами и фосфорилируют белки по необычному аминокислотному остатку — тирозилу [1, 11]. Продукты онкогенов, обуславливающих неограниченное деление (иммортализацию) клеток, таких, как *myc*, *myb*, *fos*, *myb*, *B-lim*, локализованы в ядре и придают последним способность к неограниченному делению [22]. Особое место занимает ядерный белок p53, активно связывающийся с большим Т-антигеном вируса SV-40 и способный как иммортализовать клетку, так и оказывать антиканцерогенное действие [18].

По нашим данным, в ядрах клеток злокачественных опухолей различного гистогенеза и локализации, в особенности в солидных опухолях, накапливается нерастворимая в щелочи и других растворителях белков фракция остаточного белка, могущая составлять значительную долю белков клеточного ядра [5, 6, 8, 15]. Исследование этой фракции показало, что она богата высокомолекулярными компонентами, значительно преобладающими в ядрах опухолевых клеток [10]. Соотношение фракций белков различной молекулярной массы в остаточном ядерном белке некоторых нормальных органов и опухолей крысы представлено в таблице.

Соотношение (в % от общего белка) фракций остаточного белка ядер клеток нормальных органов и сарком крыс [10]

Объект исследования	Молекулярная масса фракций, кДа		
	100	100-40	26
Печень	14	33	53
Почки	14	25	61
Селезенка	30	21	49
Саркома Йенсена	66	13	21
Саркома Йосиды	66	16	18

Эти высокомолекулярные белки с мол. м. свыше 100—150 кДа преобладают и в ядерном матриксе опухолевых клеток, главным образом солидных форм опухолей [3, 13]. Соответственно при фракционировании препаратов ядерного матрикса в случае опухолей значительно более выражена нерастворимая в щелочи четвертая фракция.

Наряду с этой особенностью в опухолях, как и во всех активно пролиферирующих клетках, ядерный матрикс обогащен ламинем В (средний белок триплета белков фиброзного слоя, «ламина» клеточного ядра) за счет ламинов А и С, которые могут даже полностью отсутствовать. Более характерно для опухолей, в особенности солидных, значительное преобладание в ядерном матриксе высокомолекулярных белков (рис. 1), не наблюдаемое в эмбриональных или регенерирующих клетках.

Природа этих высокомолекулярных компонентов ядерного матрикса не совсем ясна. Имеются указания на то, что они богаты липидными [9] и полисахаридными [4] группами. Сопоставляя это обстоятельство с выявлением высокомолекулярных гликопротеидов в составе комплексов ядерных пор [19] и с тем, что в ядерном матриксе ядерные поры электронно-микроскопически выявляются как раз в третьей фракции, обогащенной высокомолекулярными полипептидами [21], можно полагать, что частично преобладание высокомолекулярных белков в ядерном матриксе опухолей обя-

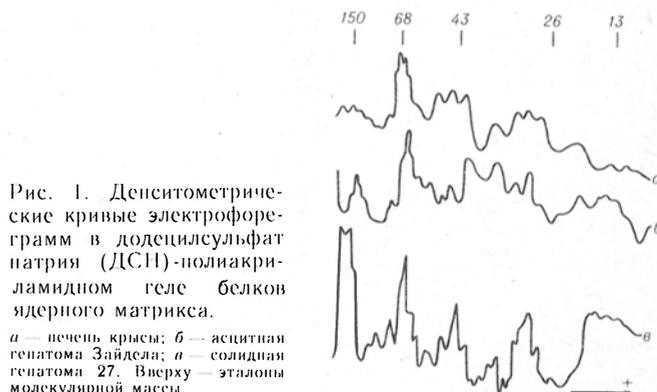


Рис. 1. Денситометрические кривые электрофоретграмм в додецилсульфат натрия (ДСН)-полиакриламидном геле белков ядерного матрикса.

а — печень крысы; б — асцитная гепатома Зайдсея; в — солидная гепатома 27. Вверху — эталоны молекулярной массы.

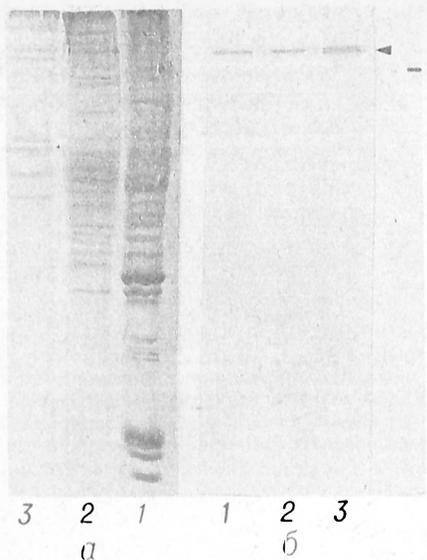


Рис. 2. Иммунопероксидазное выявление белка р260. Электрофорезграммы в 7% ДСН-полиакриламидном геле.

а — окраска кумасей синим; *б* — иммуноблот с моноклональным антителом к белку р260, сходному с MAP-2. 1 — ядра печени крысы; 2 — ядерный матрикс печени крысы; 3 — ядерный матрикс гепатомы 27.

зано гликопротеидам поровых комплексов, активно генерируемых в опухолях.

Существенно также обнаружение в ядерном матриксе высокомолекулярных ДНК-полимеразы α [23] и особенно ДНК-топоизомеразы II [20], характеризующих пролиферирующие клетки. В числе высокомолекулярных компонентов ядерного матрикса выявляется также белок р260 (молекулярная масса 260 кДа), иммунологически сходный с белком, ассоциированным с микротрубочками (MAP-2) [24]. Этот белок иммунологически выявляется в ядерном матриксе как гепатомы 27, так и нормальной печени (рис. 2). Особый интерес представляет обнаружение в ядерном матриксе раковых клеток HeLa фибронектина [26], вообще локализованно-

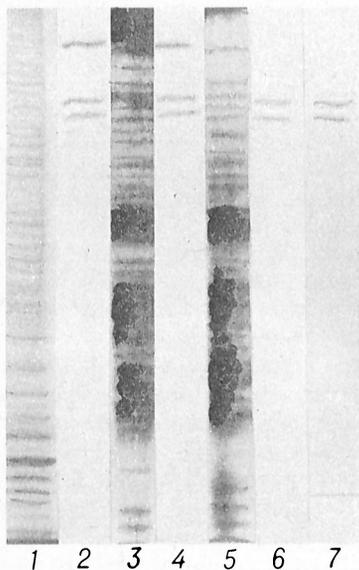


Рис. 3. Иммунопероксидазное выявление фибронектина. Электрофорезграммы в 7% ДСН-полиакриламидном геле.

1 — ядра гепатомы 27. Окраска кумасей; 2 — ядра гепатомы 27. Иммуноблот; 3 — ядерный матрикс гепатомы 27. Окраска кумасей; 4 — ядерный матрикс гепатомы 27. Иммуноблот; 5 — ядерный матрикс печени крысы. Окраска кумасей; 6 — ядерный матрикс печени крысы. Иммуноблот; 7 — ядерный матрикс гепатомы 27. Иммуноблот без специфического антитела. Верхняя полоса — фибронектин; две полосы ниже — неспецифические.

го вне клетки или на ее поверхности. В нашей лаборатории этот высокомолекулярный гликопротеин выявлен иммунопероксидазным методом в ядерном матриксе гепатомы 27, но не нормальной печени крысы (рис. 3).

В ядерном матриксе асцитной гепатомы Зайдела крысы высокомолекулярные белки отличались очень активным включением меченых аминокислот, причем это включение нарастало во времени более интенсивно, чем в другие белки ядерного матрикса [12]. Интересно, что включение именно в высокомолекулярную группу белков избирательно подавлялось хлорамфениколом, не оказывающим влияния на цитоплазматические рибосомы эукариот [2]. Это обстоятельство позволяет предполагать существование особого, возможно нерибосомного, пути биосинтеза высокомолекулярных белков ядерного матрикса по крайней мере в опухолевых клетках [25].

К наиболее важным посттрансляционным модификациям белков относится фосфорилирование, которое играет особую важную роль в регуляции дифференциальной активности генома. Действительно, белки клеточного ядра фосфорилированы в значительно большей степени, чем белки цитоплазмы, причем в изолированных ядрах фосфорилирование белков ядерного матрикса протекает в 2—3 раза интенсивнее, чем для белков ядра в целом [14, 16].

Как в асцитной гепатоме Зайдела, так и в солидной гепатоме 27 фосфорилирование белков ядерного матрикса резко активировало их протеолиз (рис. 4) [14, 25]. Особый интерес представляет то обстоятельство, что после обработки электрофорезграмм 1 М NaOH при 40 °C в течение 2 ч на автордиограмме оставались только две полосы в области 190—200 и 220 кДа (рис. 5). Так как щелочная обработка вызывает распад фосфосериновых и фосфотреониновых остатков в молекуле белка, весьма вероятно, что фосфорилирование высокомолекулярных белков ядерного матрикса опухолевой клетки происходит по остатку тирози-

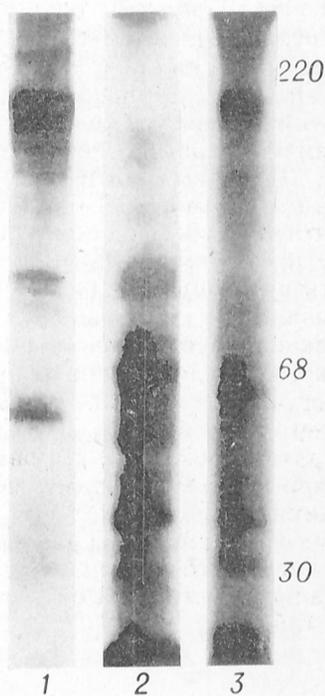


Рис. 4. Автордиограммы электрофорезграмм в 7,5% ДСН-полиакриламидном геле ядерного матрикса солидной гепатомы 27, меченного ^{32}P при 30 °C в течение 30 мин.

1 — фосфорилирование в целых ядрах ^{32}P ; 2 — ядерный матрикс изолировали в присутствии 1 мМ фенол-ртуть-сульфонилфторида и 1 мМ дитио-бис-нитробензоата; 3 — ядерный матрикс изолировали без ингибиторов и фосфорилировали $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -АТФ; 4 — ядерный матрикс изолировали в присутствии ингибиторов и фосфорилировали $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -АТФ.

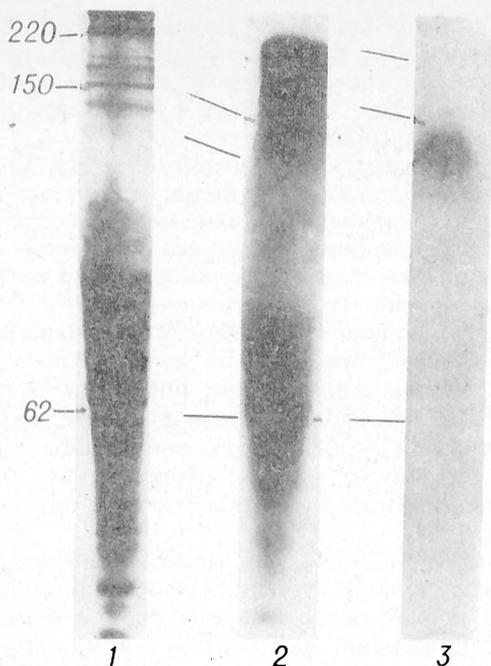


Рис. 5. Выявление устойчивых к щелочи (вероятно, фосфорилированных по тирозиновым остаткам) фосфопротеинов ядерного матрикса солидной генотомы 27 крысы.

1 — электрофореграмма в 7,5 % ДСН-полиакриламидном геле. Окраска кумасей синим; 2 — автордиограмма такого же геля; 3 — автордиограмма такого же геля после обработки 1 н. NaOH при 40 °С в течение 2 ч.

на, что характерно для действия ряда онкогенов [17].

Отмеченные особенности клеточного ядра, и в частности ядерного матрикса, опухолевой клетки отражают их высокую пролиферативную активность. Однако многие черты специфичны для злокачественных клеток и не выявляются при эмбриональном развитии или регенерации. Имеются все основания полагать, что они тесно связаны с природой и патогенезом опухолевого роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаж А. Биология опухолей: Сомнения и надежды: Пер. с венгр. — М., 1987.
2. Базарнова Т. М., Бульдьева Т. В., Кузьмина С. П., Збарский И. Б. // Биохимия. — 1984. — Т. 49. — С. 254—259.
3. Бульдьева Т. В., Кузьмина С. П., Збарский И. Б. // Докл. АН СССР. — 1989. — Т. 241. — С. 1461—1464.
4. Вокуркова П., Бульдьева Т. В., Троицкая Л. П., Збарский И. Б. // Бюл. exper. биол. — 1984. — № 1. — С. 46—48.
5. Дебов С. С. // Биохимия. — 1951. — Т. 16. — С. 314—320.
6. Збарский И. Б. // Вестн. АМН СССР. — 1965. — № 4. — С. 3—10.
7. Збарский И. Б. // Там же. — 1982. — № 3. — С. 3—10.
8. Збарский И. Б., Дебов С. С. // Докл. АН СССР. — 1948. — Т. 63. — С. 795—798.
9. Збарский И. Б., Дебов С. С. // Вопр. мед. химии. — 1955. — Т. 1. — С. 198—203.
10. Збарский И. Б., Перевощикова К. А., Филатова Л. С., Попова В. С. // Там же. — 1980. — Т. 26. — С. 406—410.
11. Киселев Л. Л. // Молекул. биол. — 1985. — Т. 19. — С. 309—323.
12. Кузьмина С. П., Бульдьева Т. В., Збарский И. Б. // Биохимия. — 1980. — Т. 45. — С. 254—259.
13. Кузьмина С. П., Бульдьева Т. В., Поликарпова С. И., Збарский И. Б. // Там же. — 1983. — Т. 48. — С. 844—850.
14. Мальдов Д. Г., Фам Ань Кыонг, Лучник А. П., Збарский И. Б. // Бюл. exper. биол. — 1984. — № 8. — С. 177—179.
15. Саидов С. М. // Вопр. онкол. — 1955. — Т. 1. — С. 46—52.
16. Alen S. L., Berezney R., Coffey D. S. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1977. — Vol. 75. — P. 111—117.
17. Bishop J. M. // Ann. Rev. Biochem. — 1983. — Vol. 52. — P. 301—354.

18. Finlay C. A., Hinds Ph. W., Levine A. J. // Cell. — 1989. — Vol. 58. — P. 1083—1093.
19. Gerace L., Ottaviano Y., Kondor-Koch C. // J. Cell Biol. — 1982. — Vol. 95. — P. 826—837.
20. Heck M. M. S., Earnshaw W. C. // Ibid. — 1986. — Vol. 103. — P. 2569—2581.
21. Kuzmina S. N., Buldyaeva T. V., Troitskaya L. P., Zbarsky I. B. // Europ. J. Cell Biol. — 1981. — Vol. 25. — P. 225—232.
22. Linder S., Marshall H. // Exp. Cell Res. — 1990. — Vol. 191. — P. 1—7.
23. Mikhailov V. S., Tsanev R. // Int. J. Biochem. — 1983. — Vol. 15. — P. 855—859.
24. Nakayasu H., Belgrader P., Hakea D. J., Berezney R. // J. Cell Biol. — 1987. — Vol. 105. — P. 70a.
25. Zbarsky I. B., Kuzmina S. N., Buldyaeva T. V., Bazarnova T. M. // Nuclear Structure and Function / Ed J. R. Harris, I. B. Zbarsky. — New York, 1990. — P. 355—359.
26. Zerlauth G., Westerska-Gadek J., Sauermann G. // J. Cell Sci. — 1988. — Vol. 89. — P. 415—421.

Поступила 17.02.91

© В. И. ГЕЛЬШТЕЙН, 1991

УДК 616-006-07:616.153.96-078.33

В. И. Гельштейн

ПРИМЕНЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К БЕЛКАМ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ ЦИТОСКЕЛЕТА В ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР, Москва

Цитоскелет практически всех разновидностей клеток животных состоит из фибрилл трех типов — микрофиламентов, микротрубочек и промежуточных филаментов (ПФ) [18]. Отличительной особенностью ПФ от других элементов цитоскелета оказалась их ярко выраженная гетерогенность биохимического состава: специфическая для каждого из гистологических типов тканей.

Структурные белки ПФ соединительной ткани представлены белком виментином, мышечной — десмином, глиальной — глиальным кислым фибриллярным белком (ГКФБ), нервной — белками нейрофиламентов, эпителиальной — большим семейством кератинов [9, 40, 41, 63].

Различия биохимического состава в клетках различных типов тканей, а также взаимосвязь морфологической организации эпителиальных тканей с набором экспрессируемых ими кератинов явились основой для использования соответствующих иммунологических тестов в практике патоморфологической онкологии.

Главной предпосылкой для использования анализа состава белков ПФ в практической онкоморфологии было наблюдение о сохранении в опухолях того же класса белков ПФ, который экспрессируется в исходной ткани [40, 78, 80, 90].

Основным методическим инструментом является применение моноклональных антител (МАТ), полученных на основе гибридомной техники.

В настоящее время в распоряжении исследователей имеется большой набор МАТ, специфически маркирующих белки разных классов ПФ, а также индивидуальные полипептидные молекулы практически всех кератинов. Большинство МАТ доступны для получения через крупнейшие био-

технологические фирмы («Amersham», «Sigma» и др.). Ряд МАТ, которые используются для анализа белков ПФ в тканях человека, получен в ВОНЦ АМН СССР и МГУ им. М. В. Ломоносова: клон 30, специфичный для виментина [10], клоны Н1 и Е3, специфичные для кератинов № 8 и 17 соответственно [4, 50, 105], клон Н₄, специфичный для большинства кератинов [1].

1. Закономерности экспрессии белков ПФ в нормальных тканях

Известно, что общепринятая в гистологии классификация тканей построена на морфологических, физиологических и гистогенетических принципах. Молекулярно-биологический признак, т. е. анализ синтеза белков ПФ, в общих чертах удивительно совпал с существующей концепцией классической гистологии.

Дифференциальная экспрессия белков ПФ тесно ассоциирована с нормальным морфогенезом и дифференцировкой клеток в разных типах тканей млекопитающих.

1.1. Исключения из правил тканевой специфичности белков ПФ в нормальных тканях

Для оценки результатов анализа состава белков ПФ в опухолях необходимо не только опираться на постулат о тканеспецифичности экспрессии этих белков, но и учитывать данные, не укладывающиеся в общие правила.

Из случаев, когда правила экспрессии белков ПФ как бы противоречат классической гистологии, можно выделить несколько разновидностей.

1. Разделение нервной ткани по набору ПФ на две большие группы — глию и собственно нейроны. Для глии характерны ПФ, получившие название глиального кислого фибриллярного белка, для нейронов — нейрофиламенты. Выявление специфических белков ПФ, таким образом, подтвердило морфологические и функциональные данные о необходимости разграничения этих типов тканей [62].

2. Выделение в некоторых типах тканей субпопуляций с неспецифическим набором белков ПФ. Например, отсутствие в некоторых субпопуляциях глии, нейронов и гладкомышечных клеток вместо специфических белков ПФ — белка мезенхимных клеток виментина [15, 61, 85, 100].

3. Сочетание в клетках некоторых типов тканей одновременно белков ПФ разной специфичности. Например, нейроэндокринные клетки экспрессируют наряду с нейрофиламентами кератины, а иногда и виментин [15, 56, 58, 70].

4. Экспрессия кератинов в некоторых субпопуляциях мезенхимных и гладкомышечных клеток плодов, эмбрионов, а иногда взрослых индивидуумов [48]. По-видимому, транзиторная экспрессия кератинов входит в программу дифференцировки мезенхимы и гладких мышц [1].

5. Особо важно подчеркнуть данные об экспрессии виментина, который традиционно считали специфическим белком ПФ для клеток мезенхимы. В настоящее время выяснено, что экспрессия виментина, помимо клеток мезенхимального ряда, присуща очень многим тканям. Как правило, экспрессия виментина сочетается со специфическим

для данной ткани белком ПФ: ГКФБ, нейрофиламентами, десмином и даже кератином [8, 25, 30, 50, 53, 68, 87].

Таким образом, виментин не может считаться специфическим маркером соединительной ткани. Однако сочетание виментина с другими белками ПФ помогает в уточнении гистогенеза определенного типа тканей и может иметь большое значение в диагностике опухолей.

1.2. Правила экспрессии белков ПФ эпителия — кератинов

Кератины представляют собой семейство из более чем 20 иммунологически и биохимически близких полипептидов, различающихся по мол. м. в пределах 40—70 кД и изоэлектрической точке. Согласно этим признакам был составлен каталог, в котором каждый полипептид получил свой порядковый номер [78]. Как правило, в одной эпителиальной клетке экспрессируется от 2 до 11 кератинов. Существуют пары кератинов, образующиеся из кислой и основной групп, имеющие принципиально одинаковые закономерности экспрессии [9].

Определены правила экспрессии кератинов, которые характеризуют типы эпителия и топографическое расположение клеток в сложном эпителиальном пласте. Практически это означает, что экспрессия кератинов отражает состояние дифференцировки эпителиальных клеток.

В таблице приведена классификация кератинов человека [27, 93].

2. Экспрессия белков ПФ в опухолях

Одним из характерных свойств опухолей является дефектность морфологических структур, образуемых неопластическими клетками. Эта дефектность варьирует в широких пределах — от высокодифференцированных новообразований, в которых прослеживаются структуры, гомологичные исходным тканям, до анапластических опухолей, в кото-

Классификация кератинов человека

Кислые кератины (тип I)		Основные кератины (тип II)		Иммунолокализация в нормальных эпителиях
мол. м., кД	№ по каталогу	мол. м., кД	№ по каталогу	
56,5	10	65—67	1/2	Эпидермис, кроме клеток базального слоя
55	12	64	3	Роговица, кроме клеток базального слоя
51	13	59	4	Базальные и супрабазальные клетки многослойных эпителиев внутренних органов и уротелия
50	14/15	58	5	Базальные и супрабазальные слои многослойных эпителиев, включая эпидермис; миоэпителий
48	16	56	6	Пролиферирующие кератиноциты (чаще в культуре ткани)
46	17			Базальные слои многослойных эпителиев, миоэпителий, камбиальные клетки (кожа, шейка матки)
45	18	54	8	Однослойные эпителии, многорядные эпителии, транзиторный эпителий (нерегулярно базальный слой многослойных эпителиев внутренних органов — № 19, но не № 7).
40	19	52	7	

рых трудно идентифицируется как структурный, так и клеточный характер исходной ткани.

Как только была установлена тканевая специфичность синтеза главных классов белков ПФ, были проведены исследования, показавшие сохранение тканевой специфичности белков ПФ при опухолевой трансформации [41, 42, 80, 88, 90]. Казалось, что вопрос о тканевой принадлежности морфологически трудноидентифицируемых опухолей может быть безоговорочно решен с помощью анализа состава белков ПФ. Однако проблема оказалась значительно сложнее [45]. Во-первых, правила тканевой специфичности экспрессии белков ПФ в норме претерпели довольно существенные изменения. Во-вторых, экспрессия главных классов белков ПФ в опухолях подчинена и своим собственным, весьма сложным и до конца не изученным закономерностям, связанным не только с гистогенезом, но и с особенностями роста новообразования на разных стадиях опухолевой прогрессии [76].

В настоящем обзоре мы представим некоторые данные, на основании которых с учетом указанных сложностей удастся все же получать факты, полезные для онкоморфологии и клинической практики.

2.1. Типирование саркомоподобных опухолей

Иммунореактивность опухолевых клеток с ГКФБ, нейрофиламентами или десмином позволяет отнести трудноидентифицируемые опухоли к разряду глиальных, нервных или мышечных опухолей соответственно [14, 35, 47, 75, 102, 104]. Экспрессия этих белков ПФ, как правило, сочетается с экспрессией виментина [51, 71, 75, 99]. В силу этого в типировании тканевой принадлежности саркомоподобной опухоли антитела к виментину носят относительный характер. К саркомоподобным опухолям, белки ПФ которых представлены только виментином, относятся гемангиомы, липосаркомы, остеогенная саркома и меланома [34].

Поскольку меланома, а также пигментный невус часто встречаются в коже, экспрессия виментина в отсутствие экспрессии кератинов имеет большое диагностическое значение для дифференциации этой опухоли с низкодифференцированными карциномами [24, 64, 74].

Таким образом, экспрессия белков ПФ в опухолях мягких тканей имеет сложный характер, что затрудняет их типирование с помощью антител только к белкам ПФ. В настоящее время для типирования мягкотканых опухолей успешно используют большой набор дополнительных маркеров [34, 91].

2.2. Опухоли эпителиальной природы

Главным маркером эпителиальных опухолей является кератин. Анализ состава кератинов в карциномах в первую очередь опирается на известные правила экспрессии кератиновых белков в нормальных тканях [1, 2].

Уже первые работы по анализу состава белков ПФ в карциномах, выполненные в основном методом двумерного электрофореза, выявили основную закономерность: аденокарциномы резко отличаются от всех других эпителиальных опухолей простотой набора кератинов и содержат кератины

однослойных (простых) кератинов в разных комбинациях (№ 8, 18, 7, 19). Плоскоклеточные и переходноклеточные карциномы независимо от локализации являются вариантами многослойной дифференцировки, свойственные нормальным многослойным эпителиям [76, 93].

Иммуногистохимический анализ при помощи высокоспецифических антител к индивидуальным кератиновым полипептидам может существенно расширить знания о характере экспрессии кератинов в опухолях, благодаря возможности анализа отдельных структурно-морфологических компонентов и индивидуальных опухолевых клеток. Работы такого рода ведутся интенсивно, часто с применением широкого набора разных МАТ к одному и тому же индивидуальному кератину [22, 44, 77, 101]. Однако результаты этих работ не всегда сопоставимы и требуют дальнейшего критического осмысления для практического применения в онкоморфологии.

Важное значение для практической медицины имеют исследования по экспрессии в эпителиальных опухолях кератинов в сочетании с белками других классов ПФ.

2.2.1. Коэкспрессия нейрофиламентов и кератинов

Выявление в некоторых типах эпителиальных опухолей наряду с кератинами маркера нейральной дифференцировки — нейрофиламентов — положило конец спорам патологоанатомов по вопросу о происхождении многих неясных ранее опухолей, так называемой APUD-системы.

Так, были получены доказательства отнесения к разряду нейроэндокринных таких опухолей, как опухоль Меркеля кожи [46, 52, 82], карциноиды бронха [19, 22], тонкого кишечника [72], мелкоклеточные (овсяноклеточные) опухоли легких [22], медуллярная карцинома щитовидной железы [36] и др.

Возможность объективного отличия нейроэпителиальных опухолей от морфологически сходных новообразований в пределах одного органа (кожа, легкие, щитовидная железа) имеет большое значение в клинике для определения прогноза и выбора метода лечения.

2.2.2. Экспрессия виментина в эпителиальных опухолях

Коэкспрессия виментина и кератина в опухолях человека впервые была описана в клетках карцином, содержащихся в асцитических и плевральных выпотах, где клетки располагаются изолированно [94].

К настоящему времени список опухолей, в которых отмечается такая коэкспрессия, достаточно велик. Среди них следует выделить, согласно морфологическим признакам, по меньшей мере три группы: опухоли железистой структуры, опухоли смешанной эпителиально-мезенхимальной структуры, опухоли саркоматозной структуры.

В группу опухолей железистой структуры попадают многие опухоли урогенитального тракта, такие, как серозная аденокарцинома яичников, эндометриальная карцинома матки [31, 69, 108], некоторые варианты рака почки [48, 64, 92]. Сочетание виментина и кератина в этих вариантах

опухолей укладывается в представление о мезодермальном происхождении этих опухолей и является дифференциально-диагностическим признаком, отличающим их от других опухолей этих органов немезодермального происхождения [76, 92]. В процессе онтогенеза в эпителиальных структурах мезодермального происхождения (метанефрос, вольфовы и мюллеровы протоки) была обнаружена транзиторная экспрессия виментина [53, 109, 111]. Тем не менее с позиций мезодермального происхождения трудно объяснить сочетание кератина и виментина в аденокарциномах цитовидной железы, легкого, толстого кишечника [36, 72, 83]. Экспрессия виментина в указанных опухолях касается отдельных опухолевых структур и клеток, в то время как кератины (№ 7, 8, 18, 19) содержатся во всех клетках.

Опухоли смешанной эпителиально-мезенхимальной структуры представляют интерес в первую очередь в связи с тем, что на их примерах прослеживается закономерная взаимосвязь между морфоструктурной организацией опухоли и экспрессией белков ПФ. Так, например, плейоморфная аденома слюнной железы морфологически многокомпонентна. В основном в ней выделяют тубулярный эпителиальный, солидный эпителиоподобный и мезенхимоподобный компоненты. Оказалось, что хотя все морфологические компоненты содержат кератины и виментин, но доля иммунореактивных клеток, экспрессирующих тот или иной белок ПФ, четко коррелирует с формой клеток и их взаимной упаковкой [5, 12, 25, 49, 60]. В эпителиальном тубулярном компоненте все клетки экспрессировали кератины (№ 8, 17) и очень немногие — виментин, в мезенхимоподобном все клетки экспрессировали виментин и около 30 % — кератины. В эпителиоподобном солидном компоненте практически все клетки коэкспрессировали кератины и виментин [5]. Таким образом, анализ состава ПФ подтвердил единый эпителиальный генез этой опухоли, а также выявил роль морфологических и структурных особенностей в регуляции экспрессии белков ПФ.

Интересные данные получены в отношении спновильных (бифазных) опухолей, а также эпителиоидных сарком. Здесь, как и в плейоморфных аденомах слюнной железы, выявлена четкая корреляция между морфоструктурной организацией опухоли и экспрессией белков ПФ [29, 64, 73].

Синовиома и, возможно, эпителиоидная саркома происходят из синовия, в котором в норме не присутствует морфологический эпителиальный компонент, но иногда выявляется кератин [57]. Появление карциноматозного компонента и соответствующей экспрессии кератинов в синовиомах, возможно, связано с тем, что в ходе онтогенеза в тканях синовиальных оболочек при отсутствии морфологических признаков эпителия могут быть выявлены некоторые эпителиальные черты по набору белков ПФ и некоторым другим маркерам [57].

Такая транзиторная биохимическая эпителизация при отсутствии морфологических признаков говорит о том, что экспрессия белков ПФ может отражать двойные потенции этой ткани, выявляющиеся при опухолевой трансформации, и ставит вопрос о существовании в нормальном организме пограничных гистологических типов тканей.

К опухолям, существующим в мезенхимоподобном, эпителиальном и смешанном вариантах, относятся также мезотелиомы. Во всех вариантах опухоли экспрессировали кератины и виментин и доля клеток, экспрессирующих тот или иной белок ПФ, взаимосвязана с морфологией опухоли [21, 66, 83].

Вопрос об отнесении нормального мезотелия к разряду эпителиальных тканей был окончательно решен лишь после того, как в мезотелиальных клетках были найдены кератины [28]. Спектр набора кератинов в эпителиальном варианте мезотелиомы имеет значение для дифференциальной диагностики этой опухоли с аденокарциномой легкого, метастазирующей в плевру. Кроме кератинов простых эпителиев (№ 7, 8, 18, 19), в мезотелиоме обычно присутствует еще и эпидермальный кератин № 5, который в аденокарциноме легкого отсутствует [28, 83].

К опухолям чисто саркоматозной структуры, в которых была выявлена экспрессия, кроме виментина, еще и кератинов, относится опухоль Юинга, лимфомы и лейомиосаркома матки. Причины подобной коэкспрессии неясны. В саркоме Юинга и лимфомах при 100 % экспрессии виментина экспрессия кератинов (№ 8 и 18) носит спорадический характер [59, 81].

В лейомиосаркоме матки и некоторых других органов экспрессия виментина и кератинов сочетается практически всегда с экспрессией десмина [23, 48]. Поскольку в рабдомиосаркомах экспрессия кератинов не встречается, сочетание виментина с десмином может быть использовано на практике для дифференциального диагноза между рабдо- и лейомиосаркомой.

2.2.3. Карциномы с простым набором кератинов

К этой группе относятся опухоли с железистым типом дифференцировки, возникающие в железистых органах. Соответственно нормальным железистым эпителиям варианты сочетаний простых кератинов в аденокарциномах могут повторять варианты исходных эпителиев, хотя встречаются и отклонения от этого правила [16, 43, 67, 96].

С наибольшим постоянством в железистых опухолях экспрессируются кератины № 8 и 18. В нейроэндокринных опухолях экспрессия кератинов № 8, 18 сочетается с экспрессией нейрофиламентов, в некоторых опухолях урогенитального тракта — с экспрессией виментина. Выявление подобного сочетания может оказаться полезным в клинике как вспомогательный признак при поисках неясного источника метастаза.

Экспрессия кератинов № 7 и 19 в аденокарциноме менее стабильна. Как правило, кератин № 7 отсутствует в аденокарциномах желудочно-кишечного тракта, что соответствует и нормальной слизистой этой системы [16, 78, 80, 89, 97]. Таким образом, набор кератинов № 8, 18, 19 в метастатической опухоли железистого строения может быть использован для направленного клинического поиска первичного очага в желудочно-кишечном тракте.

В гепатоцеллюлярных опухолях выявлены только кератины № 8 и 18 [89]. В то же время набор кератинов № 7, 8, 18, 19 характерен для холангиоцеллюлярных опухолей [89]. В печени, однако,

встречаются опухоли, морфологически и маркерно сочетающие черты гепатоцеллюлярных и холангиоцеллюлярных опухолей.

Выявление в опухолях промежуточного типа полного набора простых кератинов [38] согласуется с предположением, основанным на экспериментальных данных, о происхождении всех морфологических вариантов опухолей печени из так называемых транзиторных клеток — предшественников как гепатоцитов, так и клеток желчевыводящей системы в терминальной дифференцировке [11].

Работы, в которых иммуногистохимический анализ произведен с одновременным применением набора МАТ, реагирующих с индивидуальными кератинами в сочетании с антителами к другим белкам ПФ, позволили подробно охарактеризовать отдельные морфологические варианты карцином в пределах конкретного органа. Так, например, анализ разных вариантов железистых опухолей щитовидной железы [36] показал, что хотя все варианты карцином коэкспрессируют виментин с простыми (но не эпидермальными) кератинами, фолликулярная карцинома отличается от папиллярной очаговым распределением кератина № 19. В анапластических карциномах снижено содержание всех кератинов. В медуллярной карциноме содержатся еще и белки нейрофиламентов.

В качестве примера картирования разных вариантов опухолей внутри одного органа можно привести карциномы почки [92]. Все морфологические варианты карцином (светлоклеточные, гранулярные, эозинофильные, мелкоклеточные базофильные, хромофобно-клеточные, онкоцитомы и дедифференцированные карциномы) содержали кератины № 8 и 18, но различались по комбинациям кератинов № 7 и 19 и виментина. В светлоклеточных карциномах виментин экспрессировался, а в онкоцитомах отсутствовал, но в обеих формах отсутствовал кератин № 7 и был гетерогенен кератин № 19. Виментин отсутствовал также в хромофобных опухолях, где кератины № 7 и 19 встречались гетерогенно.

2.2.4. Карциномы со сложным набором кератинов

При анализе опухолей, происходящих из сложных стратифицированных эпителиев, основное значение имеет не только определение набора белков ПФ в опухоли в целом, но и исследование топографического распределения индивидуальных кератинов в сложном опухолевом пласте. Особый интерес вызывают так называемые базальные кератины (№ 5, 14, 15, 17), распределение которых может отражать процессы нарушения уровня дифференцировки в ходе опухолевой прогрессии [22, 44, 77, 101].

Привлекает внимание также изучение иммунолокализации кератинов № 6, 16, 4, 13, характер экспрессии которых и в нормальных тканях изучен пока недостаточно [78, 103, 106].

2.2.4.1. Плоскоклеточный рак кожи

Основной характеристикой плоскоклеточного рака кожи, в том числе ороговевающего, является резкое снижение содержания высокомолекулярных кератинов (№ 1 и 10/11), локализирующих

ся в норме в верхних ороговевающих слоях [43, 54, 107]. Эти кератины отсутствуют даже в очагах ороговения. В основном в плоскоклеточном раке кожи выявлены кератины № 14 и 5, которые в норме локализируются в базальных и супрабазальных слоях. Интерес представляют экспрессия кератина № 17 в базалиомах, а также обнаружение этого кератина в очагах ороговения [20, 110]. Кератин № 17 в нормальном эпидермисе не экспрессируется; он выявлен лишь в камбиальных клетках придатков кожи — сальных желез и волосяных фолликулов [79, 105]. Противоречивы и малочисленны данные об экспрессии кератинов № 6 и 16, которые в норме выявлены в гиперпролиферирующих кератиноцитах кожи [79, 103]. Простые кератины в раке кожи не обнаружены [43, 54, 86, 107].

2.2.4.2. Плоскоклеточный рак внутренних органов

Несмотря на значительное число работ по иммуноморфологическому анализу состава белков ПФ, в том числе индивидуальных кератинов, в опухолях легких, шейки матки, пищевода [20, 22, 43, 44, 86], результаты их трудно сопоставимы, и в настоящее время еще получено мало данных, которые могут иметь практическое значение. В первую очередь это связано с многообразием вариантов нормальных эпителиев, легких, шейки матки, пищевода и др. и их подверженности метапластическим процессам.

В настоящее время трудно сопоставлять разные работы и оценить такие важные вопросы, как роль метаплазии в опухолевой трансформации (а следовательно, гистогенез), возможность дифференциального диагноза между доброкачественными и злокачественными формами заболевания, объективные критерии уровня злокачественности и т. д. И все же некоторые выводы сделать можно. Общей чертой, сближающей плоскоклеточный рак внутренних органов с плоскоклеточным раком кожи, является резкое снижение экспрессии кератинов № 1 и 10/11 [22]. Вместе с тем для плоскоклеточного рака внутренних органов аналогично сложным эпителиям этих органов и в отличие от рака кожи характерна экспрессия простых кератинов, особенно № 19, 18, реже № 8 и почти никогда № 7 [22, 44, 86]. В отличие от нормальных прототипов в клетках плоскоклеточного рака распределение этих кератинов случайно и беспорядочно [22, 44].

Некоторые формы опухолей легких относят к группе нейроэндокринных опухолей.

Остановимся несколько подробнее на результатах анализа состава кератинов в нормальном, диспластическом (метапластическом) эпителии шейки матки и плоскоклеточном раке этого органа [44, 65, 101, собственные наблюдения], поскольку эти данные позволяют уже сейчас сделать некоторые выводы, полезные для практики.

Было показано, что метапластические и диспластические поражения, развивающиеся в эндометрии, выстланном цилиндрическим эпителием и имеющем в своем составе простые кератины (№ 7, 8, 18 и 19), содержат, кроме этих кератинов, еще кератин № 17 — маркер базальных клеток ряда сложных (но не многослойных) эпителиев [105], а в шейке матки — специфический маркер

так называемых резервных клеток. По мере нарастания черт многослойности в очагах метаплазии и дисплазии выявляются, кроме указанных, еще и кератины многослойного эпителия, характерные для экзоцервикса (№ 5, 14, 13). Плоскоклеточный рак шейки матки содержит мозаику кератинов — простых, базальных и эпидермальных. Эти данные позволяют прийти к заключению, что происхождение рака шейки матки следует связать с пролиферацией резервных клеток эндоцервикса, а экспрессия эпидермальных кератинов отражает многослойную структуру опухоли.

2.2.4.3. Переходноклеточный рак

Наиболее частая локализация переходноклеточного рака — мочевого пузыря и почечная лоханка, высланные в норме транзиторным эпителием (уротелием). Уротелий имеет сложный состав кератинов, включающий в себя простые и эпидермальные кератины (в том числе базальные) [77, 98]. С помощью индивидуальных МАТ удалось выявить дифференциальную экспрессию некоторых кератинов, приуроченную к топографическим особенностям нормального уротелия. Отмечена избирательная иммулокализация кератинов № 8 и 18 в поверхностных зонтичных клетках [95], а кератинов № 13 и 4 в базальных и супрабазальных слоях [77, 98]. Следует отметить, что этот результат воспроизводится по неясным причинам только с некоторыми из многих МАТ к одному и тому же кератину [77, 98]. Ранее были указания о том, что в переходноклеточных карциномах по мере нарастания уровня злокачественности происходит перемещение клеток, экспрессирующих кератин № 18, с зонтичных клеток в глубь пласта [95], а клеток, узнающих группу кератинов (№ 14, 16 и 17), — в противоположном направлении [26].

Удобным маркером для анализа топографических особенностей распределения иммунореактивных клеток в переходноклеточных карциномах оказались МАТ клона Е3, специфичных для кератина № 17 [105]. В нормальном уротелии кератин № 17 выявлялся нерегулярно и избирательно маркировал только клетки базального слоя [105]. В опухолях была выявлена четкая корреляция между проникновением иммунореактивных клеток от базального слоя в глубь пласта и уровнем злокачественности переходноклеточного рака. При этом было показано, что нарушение характера распределения иммунореактивных клеток опережает изменение морфоструктурных особенностей опухолевой ткани [7]. Одновременно было показано, что сочетанное применение МАТ к кератину № 17 с МАТ к простым кератинам может служить объективным маркером для выявления метапластических и анапластических форм рака мочевого пузыря. По-видимому, в опухолях разной локализации, находящихся на поздних стадиях прогрессии, одновременно может нарушаться синтез многих кератинов [12, 36, 77].

2.2.4.4. Опухоли, развивающиеся в железах, имеющих наружный миоэпителиальный слой

Из таких опухолей наиболее подробно изучены опухоли молочных желез [2—4, 13, 16, 17, 32,

50, 84]. Особенностью системы протоков молочной железы является то, что эпителий, выстилающий железистые структуры и наружный слой миоэпителия, имеет неперекрещивающийся набор кератинов. В выстилающем эпителии клетки, как и в других железах, экспрессируют простые кератины № 7, 8, 18, 19. Миоэпителий протоков содержит эпидермальные кератины, которые в ряде сложных эпителиев избирательно маркируют базальные слои (№ 5, 14, 17) [7, 13, 16, 50, 84]. В миоэпителии альвеол и ацинусов выявлен и виментин [8]. В многочисленных исследованиях с применением разных типов МАТ было показано, что в подавляющем большинстве наиболее распространенных форм карцином (протоковых, дольковых, тубулярных, папиллярных) раковые клетки экспрессируют исключительно кератины простых эпителиев [3, 4, 13, 17, 32, 50, 84]. Экспрессия в карциномах кератинов, свойственных миоэпителию, является скорее исключением, чем правилом [13, 33, 50, 84].

К карциномам с содержанием этих кератинов относятся редкие метапластические формы рака (например, рак с хондронидной метаплазией, плоскоклеточный, аденокистозный рак и др. [50]). Спорадическая экспрессия миоэпителиальных кератинов была описана также в анапластических карциномах, трудноидентифицируемых с точки зрения исходных нормальных аналогов. Одновременно в таких опухолях снижалась экспрессия простых кератинов [3, 33]. Эти факты интересны с точки зрения использования их как показателя далеко зашедшей стадии прогрессии.

На примере опухолей молочных желез выявлен еще один существенный для дифференциальной диагностики факт. Было показано, что морфологически сходные пролифераты, представляющие для патологов сложности в определении их диспластической или злокачественной природы, можно дифференцировать по спектру белков ПФ. Этот факт был независимо установлен двумя группами исследователей с применением разных клонов против белков ПФ. В одном случае использовали МАТ к кератинам № 8 и 17 и виментин [4, 6, 50], в другом — к кератинам № 8, 18, 5, 14 [55]. Было показано, что доброкачественные пролифераты представляют собой мозаику клеток, экспрессирующих одновременно кератины простых эпителиев, и кератинов, свойственных в норме миоэпителию. Морфологически сходные пролифераты злокачественной природы экспрессируют только простые кератины. Одновременное применение с МАТ к кератинам МАТ к компонентам базальных мембран усиливает объективность указанных дифференциально-диагностических критериев [6]. Возможно, разницу в составе белков ПФ в доброкачественных и злокачественных поражениях молочной железы можно объяснить тем, что, гистогенетически происходя из стволовой клетки, совмещающей экспрессию простых и миоэпителиальных кератинов [37], в случае злокачественной трансформации клетки с фенотипом выстилающих, как менее дифференцированные получают преимущество в пролиферации.

3. Значение иммуногистохимического анализа экспрессии белков ПФ для онкоморфологической практики [34, 76]

Изложенные выше основные результаты исследования состава белков ПФ в опухолях человека позволяют суммировать сферы применения этого анализа в медицинской практике: 1) типирование тканевой принадлежности саркоматозных и морфологически трудноидентифицируемых опухолей (саркомы мягких тканей, мезенхимоподобные опухоли кожи и других органов); 2) дифференциальная диагностика разных морфологических форм карцином в пределах одного органа (почка, щитовидная железа, легкое и др.); 3) дифференциальная диагностика доброкачественной или злокачественной природы морфологически сходных пролифератов (молочная железа); 4) определение степени злокачественности и выявление ранних признаков инвазии, а также мета- и анаплазии (мочевой пузырь, щитовидная железа, легкое, молочная железа); 5) обнаружение клинического первичного очага по маркерной характеристике метастаза; 6) выявление микрометастазов карцином в лимфатические узлы. В связи с тем что были получены данные об экспрессии кератинов в ретикулярных клетках лимфоузлов, в нормальном костном мозгу и в некоторых лимфомах [39, 59], указанный метод можно применять лишь как вспомогательный, когда требуется подтверждение подозрения патологоанатомов.

Все вышеперечисленные направления практического применения иммуноморфологического анализа требуют учета морфоструктурных особенностей конкретного образца опухоли (неопухольных или доброкачественных структур!) с использованием как можно более широкого спектра доступных антител и адекватным их выбором для решения поставленного вопроса. В случае анализа коэкспрессий разных белков ПФ существенное значение имеет применение серийных срезов и двойных мест. Обязательным является независимое патологоанатомическое исследование с применением доступных рутинных методов анализа. В ряде случаев желательна применение дополнительных маркеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Божок Ю. М., Банников Г. А., Тавокина Л. В. и др. // Онтогенез.— 1989.— Т. 20, № 3.— С. 250—257.
2. Гельштейн В. И., Чипышева Т. А., Ермилова В. Д. и др. // Арх. пат.— 1986.— № 6.— С. 7—14.
3. Гельштейн В. И., Чипышева Т. А., Ермилова В. Д. // Там же.— № 8.— С. 14—22.
4. Гельштейн В. И., Чипышева Т. А., Ермилова В. Д. // Биотехнология.— 1987.— № 3.— С. 701—708.
5. Гельштейн В. И., Чипышева Т. А., Ермилова В. Д. и др. // Арх. пат.— 1989.— № 10.— С. 28—34.
6. Гельштейн В. И., Чипышева Т. А., Ермилова В. Д. // Там же.— 1990.— № 9.— С. 12—18.
7. Гельштейн В. И., Чипышева Т. А., Ермилова В. Д. и др. // Там же.— 1991.— № 10.— С. 00—00.
8. Гельштейн В. И., Чипышева Т. А., Литвинова Л. В. и др. // Там же.— 1985.— № 9.— С. 53—59.
9. Трояновский С. М., Банников Г. А. // Общие проблемы физико-химической биологии.— М., 1989.— Т. 13.— С. 1—192.
10. Трояновский С. М., Банников Г. А., Бершадский А. Д. и др. // Иммунология.— 1985.— № 6.— С. 71—74.
11. Чипышева Т. А., Гельштейн В. И., Трояновский С. М. и др. // Онтогенез.— 1988.— Т. 19, № 2.— С. 138—142.
12. Achtstätter T., Moll R., Anderson A. et al. // Differentiation.— 1986.— Vol. 31.— P. 206—227.
13. Allmannsberger M., Dirk T., Droese M. et al. // Virchow's Arch. Cell path.— 1986.— Bd 51.— S. 265—275.
14. Allmannsberger M., Osborn M. // Morphol. Tumor Markers.— 1987.— P. 155—178.
15. Anderson B. H., Thorpe R., Cochen J. et al. // J. Neurocytol.— 1980.— Vol. 9.— P. 835—844.
16. Bartek J., Kovarčik J., Burchell J. et al. // Molecular Biology and Differentiation of Cancer Cell.— Budapest, 1987.— P. 123—130.
17. Bartek J., Taylor-Papadimitrou J., Miller N. et al. // Int. J. Cancer.— 1986.— Vol. 36.— P. 299—306.
18. Bershadsky A. D., Vasiliev Ju. The Cytoskeleton.— Cambridge, 1988.
19. Blobel G. A., Gould V. E., Moll R. et al. // Lab. Invest.— 1985.— Vol. 53.— P. 39—51.
20. Blobel G. A., Moll R., Franke W. W. et al. // Virchow's Arch. Cell path.— 1984.— Bd 54.— S. 407—429.
21. Blobel G. A., Moll R., Franke W. W. et al. // Amer. J. Path.— 1985.— Vol. 212.— P. 325—347.
22. Broers J. L. V., Rol M. K., Oostendorp T. et al. // Cancer Res.— 1987.— Vol. 47.— P. 3225—3234.
23. Brown D. S., Theaker J. M., Banks P. M. et al. // Histopathology.— 1987.— Vol. 11.— P. 477—486.
24. Caselitz J., Janner M., Breibart E. et al. // Virchow's Arch. Cell path.— 1983.— Bd 400.— S. 43—51.
25. Caselitz J., Osborn M., Seifert G. et al. // Ibid.— 1981.— Bd 393.— S. 273—281.
26. Cintonino M., DelVecchio M. T., Bugnoli M. E. et al. // J. Urol. (Baltimore).— 1988.— Vol. 139.— P. 428—432.
27. Cooper D., Schermer A., Sun T.-T. // Lab. Invest.— 1985.— Vol. 52.— P. 243—256.
28. Corson J. M. // Path. Annual.— 1986.— Vol. 21, Pt 2.— P. 47—81.
29. Corson J., Weiss L. M., Banks-Schlegel S. P. // Amer. J. Surg. Path.— 1983.— Vol. 7.— P. 107—109.
30. Czernobilsky B., Moll R., Levy R. et al. // J. Cell Biol.— 1985.— Vol. 37.— P. 175—190.
31. Dabbs D. J., Geisinger K. R. // Cancer (Philad.).— 1988.— Vol. 62.— P. 368—374.
32. Dairkee S. H., Ljung B. M., Smith S. I. et al. // Breast Cancer Res. Treat.— 1987.— Vol. 114.— P. 309—321.
33. Dairkee S. H., Puett J., Hackett A. J. // J. nat. Cancer Inst.— 1988.— Vol. 80.— P. 691—695.
34. Damjanov J. // Morphol. Tumor Markers.— 1987.— P. 367—384.
35. Dias P., Kumar P., Mardsen H. B. // Brit. J. Cancer.— 1987.— Vol. 56.— P. 361—365.
36. Dockho -Dworniczak B., Franke W. W., Schröder W. et al. // Differentiation.— 1987.— Vol. 35.— P. 53—71.
37. Dulbecco R., Unger M., Armstrong B. et al. // Proc. nat. Acad. Sci.— 1983.— Vol. 80.— P. 1033—1037.
38. Fischer H.-P., Doppl W., Osborn M. et al. // Virchow's Arch.— 1988.— Bd 56.— S. 71—76.
39. Franke W. W., Moll R. // Differentiation.— 1987.— Vol. 36.— P. 145—163.
40. Franke W. W., Schmid E., Schiller D. L. et al. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.— 1982.— Vol. 46.— P. 431—453.
41. Franke W. W., Schmid E., Osborn M. et al. // Proc. nat. Acad. Sci.— 1978.— Vol. 75.— P. 5034—5038.
42. Gabbiani G., Kapanci J., Barazzano O. et al. // Amer. J. Path.— 1981.— Vol. 104.— P. 206—216.
43. Gatter K. S., Abdulaziz J., Beverley P. et al. // J. clin. Path.— 1982.— Vol. 35.— P. 1253—1267.
44. Gigi-Leithner O., Geiger B., Levy R. et al. // Differentiation.— 1986.— Vol. 31.— P. 191—205.
45. Gould V. E. // Hum. Path.— 1986.— Vol. 17.— P. 212—215.
46. Gould V. E., Moll R., Moll I. et al. // Lab. Invest.— 1985.— Vol. 52.— P. 334—353.
47. Gould V. E., Moll R., Moll I. et al. // Ibid.— 1986.— Vol. 55.— P. 463—474.
48. Gown A. M., Boyd H. C., Chang Y. // Amer. J. Path.— 1988.— Vol. 132.— P. 223—232.
49. Gown A. M., Vogel A. // Amer. J. clin. Path.— 1985.— Vol. 84.— P. 413—424.
50. Guelstein V. I., Tchipyssheva T. A., Ermilova V. D. et al. // Int. J. Cancer.— 1988.— Vol. 42.— P. 147—153.
51. Herpers M. J. H. M., Ramaekers F. C. S., Aldeweireldt J. et al. // Acta neuropath.— 1986.— Vol. 70.— P. 333—339.
52. Hoefler H., Kerl H., Laekinger E. et al. // Virchow's Arch.— 1985.— Bd 405.— S. 339—350.
53. Holthofer H., Miettinen A., Lehto V. P. // Lab. Invest.— 1984.— Vol. 50.— P. 552—559.
54. Huszar M., Gigi-Leithner O., Moll R. et al. // Differentiation.— 1986.— Vol. 31.— P. 141—153.
55. Jarasch E. D., Nagle R. B., Kaufmann M. et al. // Hum. Path.— 1988.— Vol. 19.— P. 276—289.

56. Kasper M., Goerckchen R., Stosiek P. et al. // *Virchow's Arch. Path. Anat.*— 1986.— Bd 410.— S. 173—177.
57. Kasper M., Stosiek P., Karten U. // *Acta histochem.*— 1988.— Vol. 84.— P. 107—108.
58. Kouno M., Kumaniski T., Washiyama K. // *Acta neuropath.*— 1988.— Vol. 75.— P. 317—320.
59. Kovarčik J., Reithar A., Lanerova L. et al. // *Int. J. Cancer.*— 1988.— Suppl. 3.— P. 50—55.
60. Krepler R., Denk H., Artlieb U. // *Differentiation.*— 1982.— Vol. 21.— P. 191—199.
61. Lawrence F. // *J. Neuroimmunol.*— 1985.— Vol. 8.— P. 203—214.
62. Lazarides E. // *Nature.*— 1980.— Vol. 283.— P. 249—256.
63. Lazarides E. // *Ann. Rev. Biochem.*— 1982.— Vol. 51.— P. 219—250.
64. Leader M., Collins M., Patel J. et al. // *Histopathology.*— 1987.— Vol. 11.— P. 63—72.
65. Levi R., Czernobilsky B., Geiger B. // *Differentiation.*— 1988.— Vol. 39.— P. 185—195.
66. Lucas Z., Bartek J., Bartkova J. et al. // *Path. Res. Pract.*— 1987.— Vol. 182.— P. 520—526.
67. Makin C. A., Bobrow L. G., Bodmer W. F. // *J. clin. Path.*— 1984.— Vol. 37.— P. 975—983.
68. Mali P., Virtanen I., Parvinen M. // *Andrologia.*— 1987.— Vol. 19.— P. 644—653.
69. McNutt M. A., Bolen J. W., Gowen A. M. et al. // *Ultrastruct. Path.*— 1985.— Vol. 9.— P. 31—43.
70. Miettinen M., Clark R., Virtanen J. // *Amer. J. Path.*— 1986.— Vol. 123.— P. 231—240.
71. Miettinen M., Lehto V.-P., Badley R. A. et al. // *Int. J. Cancer.*— 1982.— Vol. 30.— P. 541—546.
72. Miettinen M., Lehto V.-P., Dahl D. et al. // *Lab. Invest.*— 1985.— Vol. 52.— P. 429—436.
73. Miettinen M., Lehto V. P., Virtanen I. // *Virchow's Arch.*— 1982.— Bd 40.— S. 157—161.
74. Miettinen M., Lehto V. P., Virtanen I. // *Arch. Derm.*— 1985.— Vol. 121.— P. 736—741.
75. Molenaar W. M., Oosterhuis J., Ossterhuis A. M. et al. // *Hum. Path.*— 1985.— Vol. 16.— P. 838—843.
76. Moll R. // *Morphol. Tumor Markers.*— 1987.— P. 71—101.
77. Moll R., Achstatter T., Becht E. et al. // *Amer. J. Path.*— 1988.— Vol. 132.— P. 123—144.
78. Moll R., Franke W. W., Schiller D. L. et al. // *Cell.*— 1982.— Vol. 31.— P. 11—24.
79. Moll R., Franke W. W., Volk-Platzet B. et al. // *J. Cell Biol.*— 1982.— Vol. 95.— P. 285—298.
80. Moll R., Krepler R., Franke W. W. // *Differentiation.*— 1983.— Vol. 23.— P. 256—269.
81. Moll R., Lee I., Gould V. E. et al. // *Amer. J. Path.*— 1987.— Vol. 127.— P. 288—304.
82. Moll R., Osborn M., Hartshuh W. et al. // *Ultrastruct. Path.*— 1986.— Vol. 10.— P. 473—495.
83. Mullink H., Herzen-Lagnans S. // *Virchow's Arch.*— 1986.— Bd 52.— S. 55—56.
84. Nagle R. B., Boeker W., Davis J. R. et al. // *J. Histochem. Cytochem.*— 1986.— Vol. 34.— P. 869—881.
85. Nakanishi K., Okuda M., Mazaki T. et al. // *Acta histochem. cytochem.*— 1988.— Vol. 21.— P. 175—185.
86. Nelson W. G., Battifora H., Santana H. et al. // *Cancer Res.*— 1984.— Vol. 44.— P. 1600—1603.
87. Osborn M., Caselitz J., Weber K. // *Differentiation.*— 1981.— Vol. 20.— P. 196—202.
88. Osborn M., Geisler N., Shaw D. et al. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*— 1981.— Vol. 46.— P. 413—419.
89. Osborn M., van Lessen G., Weber K. et al. // *Lab. Invest.*— 1986.— Vol. 55.— P. 497—504.
90. Osborn M., Weber K. // *Ibid.*— 1983.— Vol. 48.— P. 372—394.
91. Otto H. F., Berndt R., Schwechheimer K. et al. // *Morphol. Tumor Markers.*— 1987.— P. 179—205.
92. Pitz S., Moll R., Storkel S. et al. // *Lab. Invest.*— 1987.— Vol. 56.— P. 642—653.
93. Quintan R. A., Schiller D. L., Hatzfeld M. et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1985.— Vol. 455.— P. 282—306.
94. Ramaekers F. C. S., Haag D., Rant A. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1983.— Vol. 80.— P. 1618—1626.
95. Ramaekers F. C. S., Moesker O., Huysmans A. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1985.— Vol. 455.— P. 614—634.
96. Ramaekers F. C. S., Puts J. J. C., Moesker O. et al. // *Lab. Invest.*— 1983.— Vol. 49.— P. 353—361.
97. Ramaekers F. C. S., van Niekerk C., Poels I. et al. // *Amer. J. Path.*— 1990.— Vol. 136.— P. 641—655.
98. Schaafsma H. E., Ramaekers F. C. S., van Muijen G. N. P. et al. // *Ibid.*— P. 329—343.
99. Schiffer D., Giordana M. T., Mauro A. et al. // *Acta neuropath.*— 1986.— Vol. 70.— P. 209—219.
100. Schnitzer J., Franke W. W., Schachner M. // *J. Cell Biol.*— 1981.— Vol. 90.— P. 435—447.
101. Smedts F., Ramaekers F., Robben H. et al. // *Amer. J. Path.*— 1990.— Vol. 136.— P. 657—668.
102. Stanton C., Perentes E., Collins V. P. et al. // *J. Neuropath. exp. Neurol.*— 1987.— Vol. 46.— P. 634—643.
103. Stoler A., Kopan R., Duvic M. et al. // *J. Cell Biol.*— 1988.— Vol. 107.— P. 427—445.
104. Trojanowski J. Q. // *J. Histochem. Cytochem.*— 1987.— Vol. 9.— P. 999—1003.
105. Troyanovsky S. M., Guelstein V. I., Tchipyshova T. A. et al. // *J. Cell Sci.*— 1989.— Vol. 93.— P. 419—426.
106. Van Muijen G. N. P., Ruiter D. J., Franke W. W. et al. // *Exp. Cell Res.*— 1986.— Vol. 162.— P. 97—113.
107. Viac J., Reano A., Thivolet J. // *J. cutan. Path.*— 1982.— Vol. 9.— P. 377—390.
108. Viale G., Gambacorra M., Dell'Orro P. // *Virchow's Arch.*— 1988.— Bd 413.— S. 91—101.
109. Viebahn C., Lane E. B., Ramaekers F. C. S. // *Differentiation.*— 1987.— Vol. 34.— P. 175—188.
110. Weiss R. A., Eichner R., Sun T. T. // *J. Cell Biol.*— 1984.— Vol. 98.— P. 1397—1406.
111. Wernert N., Seitz G., Achtstätter T. // *Path. Res. Pract.*— 1987.— Vol. 182.— P. 617—626.

Поступила 13.03.91

© М. В. НЕСТЕРОВА, 1991

УДК 576.385.5:576.351.053.4

М. В. Нестерова

ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ

Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения Минздрава СССР, Москва

Циклические нуклеотиды участвуют в регуляции основных процессов жизнедеятельности. Спектр действия цАМФ очень широк и включает в себя не только функцию регуляции метаболизма гликогена, но и модуляцию таких процессов, как клеточный рост и дифференцировка [21]. Имеются противоречия в оценке значения цАМФ для регуляции клеточного деления [10, 14].

Функционирование системы циклических нуклеотидов сопряжено с катализируемым цАМФ-зависимой протеинкиназой фосфорилированием ряда белков.

Обнаружены две формы цАМФ-зависимых протеинкиназ [8]. Обе формы — I и II — являются тетрамерами, которые после активации диссоциируют с образованием димера регуляторной субъединицы и двух молекул свободной каталитической субъединицы. Протеинкиназа I характеризуется высокой скоростью реассоциации регуляторной и каталитической субъединиц. Протеинкиназа II диссоциирует медленно, но быстро реассоциирует после удаления агентов, вызывающих диссоциацию [8]. Протеинкиназа II катализирует автофосфорилирование, заключающееся в переносе фосфата на регуляторную субъединицу в составе холофермента [3].

Такие различия в свойствах протеинкиназ, находящихся под контролем цАМФ, указывают на то, что эти два типа ферментов функционируют при различных состояниях клетки. Относительное содержание протеинкиназы I и II варьирует не

Ингибирование роста различных линий опухолевых клеток человека под действием сайт-селективных аналогов цАМФ

Линия клеток	IC ₅₀ , мкМ		
	8-Cl	N ⁶ -бензил	N ⁶ -фенил-8-р хлорфенилто
Рак молочной железы:			
MCF-7	10	20	17
MCF-7gas	5	15	20
MDA-MB-231	18	20	30
T-47D	20	20	19
ZR-75-1	20	20	19
BT-20	19	27	20
Рак желудка:			
IS-174T	1	18	27
WiDr	10	15	27
HT-29	10	25	25
Рак легких A549	10	18	20
Фибросаркома HT-1080	20	20	25
Саркома Ивинга A4573	18	15	20
Глиома:			
FOG	18	10	15
U251	25	18	18

только в течение клеточного цикла, но и в различных тканях [9, 16]. Возможно, что протеинкиназа I является положительным эффектором роста, тогда как протеинкиназа II ингибирует клеточное деление [15].

Таким образом, модулируя активность этих изозимов, можно регулировать процесс клеточного деления, сдвигая равновесие в системе пролиферация — дифференцировка. Такое изменение соотношения протеинкиназы I и II в клетке и является на сегодняшний день основной стратегической задачей при попытках использования циклических нуклеотидов в качестве противоопухолевых препаратов. Разработки этого направления ведутся по двум основным линиям. Одна из них предполагает использование так называемых сайт-селективных аналогов цАМФ, а другая — антисмысловых олигонуклеотидов к мРНК субъединиц протеинкиназ обоих типов.

Установлено, что высокий уровень цАМФ максимально и в равной степени активирует оба изоэзоима протеинкиназ [12]. Кинетические исследования связывания цАМФ показали существование аналогов этого вещества, которые могут селективно взаимодействовать с одним из цАМФ-связывающих участков регуляторной субъединицы (рис. 1) и обнаруживать определенную избирательность в отношении протеинкиназ различных типов [19, 20]. Было установлено, что аналоги цАМФ, имеющие атом азота в положении 8 аденинового кольца, обладают большим сродством к протеинкиназе I, а замещение в положении 8 на серу или галогены придает значительное сродство их, т. е. аналогов, к протеинкиназе II [20].

Накоплено много данных об отношении к регуляции клеточного роста цАМФ, однако его истинная роль в этом процессе не установлена [1]. Это объясняется, в частности, тем, что опыты проводились обычно с применением либо аналогов цАМФ (дibuтирил-цАМФ), которые требуют использования их в нефизиологически высоких (миллимолярных) концентрациях, либо агентов, длительно повышающих уровень цАМФ до аномально высоких значений [5, 6, 14]. Поскольку цАМФ опосредует множество биологических эф-

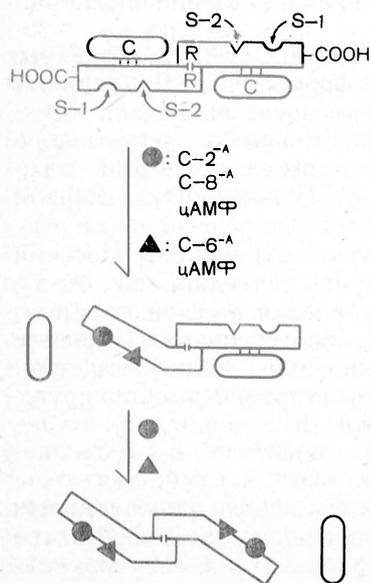


Рис. 1. Модель структурных доменов цАМФ-зависимой протеинкиназы.

s-1 и s-2 — центры связывания цАМФ и его аналогов регуляторной субъединицы; R — регуляторная субъединица; C — каталитическая субъединица. А — аналог.

фектов, его нефизиологически высокий уровень нарушает многие клеточные процессы неспецифически, что выражается, в частности, в маскировке его физиологической функции регуляции клеточного деления. Сайт-селективные аналоги цАМФ можно использовать в исключительно низких концентрациях: они обладают хорошей проницаемостью через клеточную мембрану и являются плохими субстратами для таких ферментов, как фосфодиэстеразы и ацетилазы [11]. Испытано действие сайт-селективных аналогов цАМФ на различные линии раковых клеток, в частности, человека. Было исследовано 24 аналога цАМФ: С-2, С-6, С-8 — однозамещенных и С-2, С-8, С-6, С-8 — двузамещенных [11]. В табл. 1 даны значения IC₅₀ (концентрация, ингибирующая клеточную пролиферацию на 50 %) для наиболее эффективных сайт-селективных аналогов цАМФ. Представленные в табл. 1 клеточные линии обнаруживают полную резистентность к dibутирил-цАМФ. При изучении кинетики превращения 8-Cl-цАМФ после добавления этого аналога в культуральную среду было показано, что цитостатический эффект в данном случае достигается за счет действия самого аналога, а не токсического эффекта аденозина или других метаболитов [11]. Установлено также, что ингибирующее действие аналогов цАМФ не связано со специфическим блокированием какой-либо стадии клеточного цикла в отличие от 8-Cl-аденозина, который вызывает значительное накопление клеток в фазе G₁ [22].

Интересные исследования действия сайт-селективных аналогов цАМФ были проведены на различных линиях лейкемии [4, 13, 23]. Было установлено, что обработка клеток 8-Cl-цАМФ вызывает увеличение синтеза моноцитспецифических антигенов и уменьшение синтеза антигенов незрелых клеток-предшественников (табл. 2). Клетки, обработанные 8-Cl-цАМФ, приобретают строгую позитивность по отношению к α-нафтилбутиратэстеразе — цитохимическому маркеру моноцитов и проходят морфологическую трансформацию, характерную для моноцитов, выражающуюся в уменьшении отношения поверхности

Таблица 2

Модуляция дифференцировочных маркеров клеток линии HL-60 под действием 8-Cl-цАМФ (в %)

Маркеры	Контроль	8-Cl-цАМФ (20 мкМ)
My 7	81	11
My 9	75	54
Leu M1	72	0
Leu M5	0	0
MO ₂	0	75
OKM ₅	0	51

ядра к цитоплазме. При этом цитоплазма обильно вакуолизируется и происходит потеря ядрышек. 8-Cl-цАМФ вызывает в клетках человеческой Т-лимфоцитарной лейкемии понижение активности терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы, что характерно для выхода клеток в дифференцировку [4]. На подобного рода клетках было показано подавление синтеза протоонкогенов *c-myc* и *c-ras* после обработки культур 8-Cl-цАМФ [23].

В связи с тем что использование сайт-селективных аналогов цАМФ как ингибиторов роста различных культур опухолевых клеток дало положительные результаты, была предпринята попытка испытать эти вещества *in vivo*. В настоящее время 8-Cl-цАМФ был исследован на различных перевиваемых линиях опухолей на атимических мышах [7]. При этом было получено ингибирование роста опухолей порядка 45%. Нами был использован этот же аналог для введения мышам, зараженным меланомой В16. Внутривенные инъекции 8-Cl-цАМФ, проводимые последовательно в течение 7 дней в концентрации аналога 20 мг/кг в день, давали снижение скорости роста опухоли около 60%.

Каковы же молекулярные механизмы цАМФ-зависимого ингибирования клеточной пролиферации? При исследовании экстрактов опухоли меланомы В16 с помощью хроматографии на

ДЭАЭ-целлюлозе до и после инъекций 8-Cl-цАМФ было установлено, что в процессе замедления скорости роста опухоли происходит изменение соотношения протеинкиназы I и II (рис. 2). На рис. 2 видно, что в контрольных клетках преобладает активность протеинкиназы I, а в клетках, обработанных 8-Cl-цАМФ, наблюдается значительное увеличение активности протеинкиназы II.

Очень важные данные были получены при изучении механизмов цАМФ-зависимого ингибирования опухолевого роста с помощью антисмысловых олигонуклеотидов к мРНК субъединиц протеинкиназы I и II. Было установлено, что только использование антисмысловой последовательности к мРНК регуляторной субъединицы II приводит к нарушению восприимчивости клетки к действию аналогов цАМФ.

Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют в пользу особой роли регуляторной субъединицы II в проведении внешних сигналов. В настоящее время установлено, что регуляторная субъединица протеинкиназы II транслоцируется в ядро [17]. Этот процесс имеет ряд интересных особенностей.

Для исследования процесса транслокации регуляторной субъединицы II в ядро нами была применена культура нормальных фибробластов мыши (NIH-3T3) и фибробластов со сниженным уровнем цАМФ в результате трансформации вирусом SV-40. На рис. 3 показана транслокация экзогенной меченой ¹²⁵I регуляторной субъединицы протеинкиназы из мозга при введении ее в клетки 3T3 с помощью телячьих эритроцитов. Было установлено также, что после транслокации регуляторной субъединицы в ядро она локализуется в непосредственной близости от ядрышек. Для культуры клеток 3T3 наблюдается не только четкая транслокация регуляторной субъединицы в ядро, но и накопление этого белка на метафазных хромосомах [17]. В то же время транслокация меченой регуляторной субъединицы в ядра и акцентция на хромосомах трансформированных вирусом SV-40 клеток практически не наблюдаются. Это может свидетельствовать о том, что в клетках SV-40-3T3 нарушена система транспорта протеинкиназы через мембрану. При введении в систему регуляторной субъединицы совместно с цАМФ в значительной степени восстанавливались проникновение меченого белка в ядро и акцентция его на метафазных хромосомах. Это может означать, что трансформация клеток 3T3 вирусом SV-40 не приводит к изменению специфических мест связывания регуляторной субъединицы на хроматине, а вызывает, по-видимому, изменение системы генерации цАМФ, которая связана с транспортом субъединицы в ядро.

В связи с упомянутыми выше особенностями транслокации регуляторной субъединицы в ядро и влиянием на этот процесс опухолевой трансформации клетки было целесообразно сравнить процесс транспорта этого белка в ядро для клеток, подвергшихся неопластической трансформации другого типа. Этот процесс был исследован для случаев спонтанного рака (клетки KB, HeLa, Hep). Оказалось, что в таких клетках регуляторная субъединица проникает в ядро, но не акцентируется хромосомами. При добавлении цАМФ результаты не изменяются. Это дает основание предпола-

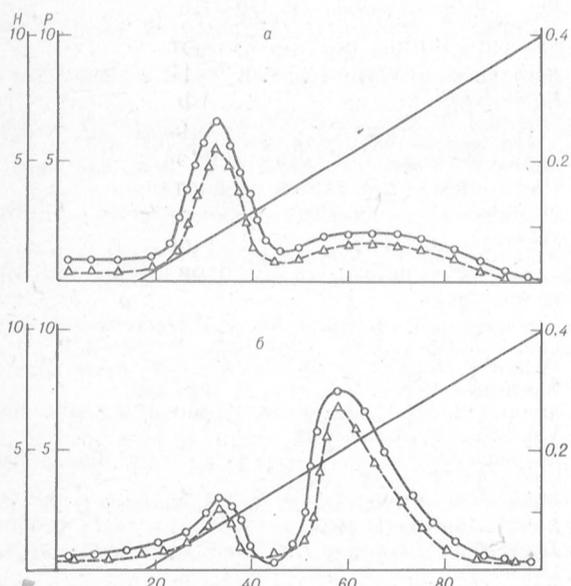


Рис. 2. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе экстракта клеток меланомы В16 до (а) и после (б) инъекций 8-Cl-цАМФ.

1 — протеинкиназная активность; 2 — цАМФ-связывающая активность. По оси абсцисс — номера фракций; по оси ординат: слева — ³¹P, имп/мл · 10⁻³ и ³²P, имп/мл · 10⁻³, справа — концентрация NaCl, М.

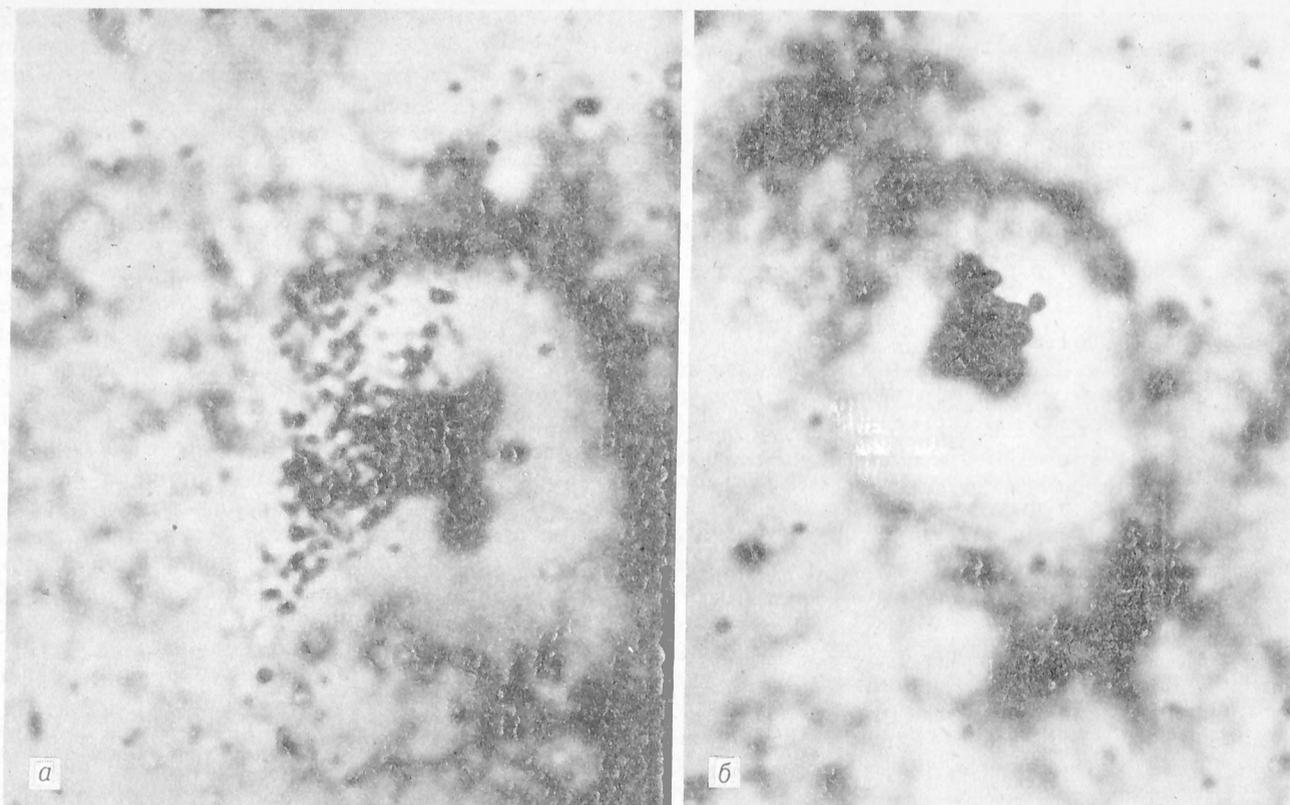


Рис. 3. Микрофотография клеток NIH-3Т3 через 6 ч (а) и 12 ч (б) после введения регуляторной субъединицы. Ув. 2800.

гать, что взаимодействие регуляторной субъединицы с генетическим материалом клеток типа КВ отличается от взаимодействия нормальных и трансформированных вирусом клеток.

Исходя из полученных результатов, можно сделать предположение, что механизм цАМФ-зависимой регрессии опухолей связан с существованием в клетке регуляторной субъединицы П, способной воспринять цАМФ, беспрепятственно проникнуть в ядро и акцентироваться в специфическом акценторном участке хроматина. Если какой-либо компонент этой системы будет необратимо нарушен, то такая клетка становится индифферентной к действию цАМФ. В некоторых случаях может даже повышаться пролиферативная активность в связи с наложением многих факторов, связанных с плеiotропностью действия цАМФ.

Из приведенных данных можно заключить, что компартиментализация цАМФ-зависимой протеинкиназы, в частности ее регуляторной субъединицы, играет важную роль в процессе жизнедеятельности, а нарушения, возникающие при неопластической трансформации, существенным образом связаны с изменением ядерно-цитоплазматических взаимоотношений, и в частности транслокации протеинкиназы в ядро.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нестерова М. В., Соломин Р. О., Северин Е. С. // Успехи биол. химии.— 1982.— Т. 22.— С. 63—75.
2. Нестерова М. В., Глухов А. И., Априкин А. Г., Северин Е. С. // Биохимия.— 1987.— Т. 52.— С. 1150—1153.
3. Ульмасов Х. А., Нестерова М. В., Северин Е. С. // Там же.— 1980.— Т. 45.— С. 661—668.
4. Bollum F. J. // Blood.— 1979.— Vol. 54.— P. 1203.
5. Boynton A. L., Whitfield J. F. // Advanc. Cycl. Nucl. Res.— 1983.— Vol. 15.— P. 193—294.
6. Cho-Chung Y. S. // Influence of Hormones on Tumor Development.— Boca Raton, 1979.— Vol. 1.— P. 55—93.
7. Cho-Chung Y. S., Clair T., Tagliaferri P. et al. // Cancer invest.— 1989.— Vol. 7.— P. 161—177.
8. Corbin J. D., Keely S. L., Park C. R. // J. biol. Chem.— 1975.— Vol. 250.— P. 218—225.
9. Fleischer N., Rosen O. M., Reichlin M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1976.— Vol. 73.— P. 54—58.
10. Hixon R. H., Whitfield J. F., McManus P. // Exp. Cell Res.— 1970.— Vol. 63.— P. 110—116.
11. Katsaros D., Tortora G., Tagliaferri P. et al. // FEBS Lett.— 1987.— Vol. 223.— P. 97—103.
12. Krebs E. G. // Curr. Top. Cell. Regul.— 1972.— Vol. 5.— P. 99—133.
13. Levene R. B., Lamaziere J.-M. D., Broxmeyer H. E. et al. // J. exp. Med.— 1984.— Vol. 161.— P. 457—475.
14. Moens W., Vokaer A., Kram R. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1975.— Vol. 73.— P. 1063—1067.
15. McMahon D. // Science.— 1974.— Vol. 184.— P. 1012—1021.
16. Nesterova M. V., Sashchenko L. P., Vasiliev V. Y., Severin E. S. // Biochim. biophys. Acta.— 1975.— Vol. 377.— P. 271—281.
17. Nesterova M. V., Ulmasov Kh. A., Abducarimov A. et al. // Exp. Cell Res.— 1981.— Vol. 132.— P. 367—373.
18. Pastan I., Johnson G. S., Anderson W. B. // Ann. Rev. Biochem.— 1975.— Vol. 44.— P. 491—522.
19. Rannets S. R., Corbin J. D. // J. biol. Chem.— 1980.— Vol. 255.— P. 7085—7088.
20. Robinson-Steiner A. M., Corbin J. D. // Ibid.— 1983.— Vol. 258.— P. 1032—1040.
21. Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W. Cyclic AMP.— New York, 1971.
22. Tagliaferri P., Katsaros D., Clair T. et al. // Cancer Res.— 1988.— Vol. 48.— P. 1642—1650.
23. Tortora G., Tagliaferri P., Clair T. // Blood.— 1988.— Vol. 71.— P. 230—233.

Поступила 19.02.91

Л. А. Локшина

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ В ПРОЦЕССАХ ОНКОГЕНЕЗА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Представление о том, что протеолитические ферменты ассоциированы со злокачественным ростом, сложилось давно и базируется на двух группах многочисленных данных: 1) на опухолях разного генеза, на обширном клиническом материале, а также и на линиях трансформированных клеток установлено, что активность протеолитических ферментов в ткани опухоли выше, чем в соответствующей нормальной ткани. Чем агрессивнее опухоль, тем выше в ней активность протеолитических ферментов [1, 8, 21, 40, 64]; 2) в опытах *in vitro* и *in vivo* обнаружено антиканцерогенное действие ингибиторов протеиназ. Показано, что целый ряд ингибиторов тормозит трансформацию разных линий клеток, а у экспериментальных животных препятствует развитию индуцированных опухолей, их росту и метастазированию [1, 7, 8, 21, 63, 64].

Функции протеолитических ферментов в процессах злокачественного роста многообразны и разноплановы. Эти ферменты не только участвуют в различных этапах многоступенчатого процесса канцерогенеза, но и вовлечены в сложную цепь взаимоотношений раковой клетки с близлежащими нормальными тканями и различными регуляторными и защитными системами организма хозяина [7, 8, 21, 40, 41, 64]. Протеиназы характеризуются множественностью биологических эффектов и включены, по-видимому, как в нарушение контроля роста и формирование трансформированного фенотипа раковых клеток, так и в их инвазивную активность, способность к миграции, процессы ангиогенеза [7, 8, 21, 33, 64]. Функции отдельных протеиназ в большинстве из указанных процессов еще неясны и являются предметом многих исследований. Для их расшифровки большое значение имеют модельные системы, которые были предложены в последнее время для исследования отдельных этапов канцерогенеза. С помощью трансфекции различных онкогенов были получены линии клеток, отличающиеся по своей туморогенной и метастатической активности; на них удалось проследить различия в экспрессии отдельных протеиназ и выяснить их связь с процессами туморогенеза и метастазирования [12, 16, 20, 35]. Использование в качестве моделей для изучения инвазии амниотической или хориоаллантоисной мембраны дало возможность оценить вклад отдельных ферментов в инвазивную активность клеток [39, 44, 51, 52, 56, 69].

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что в процессах онкогенеза участвуют протеиназы разных типов: сериновые, цистеиновые, аспартильные, металлопротеиназы. Эти ферменты могут иметь различную субклеточную и внеклеточную локализацию [1, 21, 34, 40, 41, 64].

В настоящем обзоре мы остановимся на неко-

торых протеиназах, а именно на активаторе плазминогена (АП), катепсинах В, L, D и коллагеназах, т. е. ферментах, которым уделяется в последнее время наибольшее внимание в связи с их участием в процессах онкогенеза. Мы рассмотрим возможную роль этих ферментов в процессах неопластической трансформации клеток, инвазии и метастазировании, а также коснемся перспектив их определения в клинических условиях с диагностическими и прогностическими целями. Более подробные сведения об участии АП [7, 14, 21, 33, 51], катепсинов В и L [49, 57, 58], коллагеназ [34, 35, 64] и других протеиназ [1, 41, 53, 54, 64] в процессах злокачественного роста представлены в соответствующих обзорах.

Протеиназы в процессах неопластической трансформации клеток

Сериновые протеиназы: АП. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что опухоли разного гистогенеза и различные трансформированные клетки синтезируют и секретируют в среду большое количество сериновых протеиназ, активирующих плазминоген [7, 14, 21, 33, 40, 64]. Известно два основных типа АП, различающиеся по физико-химическим, энзимологическим и иммунологическим свойствам: тканевый АП (т-АП), вырабатываемый главным образом эндотелиальными клетками, и АП урокиназного типа (у-АП), который продуцируется целым рядом нормальных и трансформированных клеток [7, 14, 21, 33, 40, 64]. Функцию т-АП, обладающего наибольшим сродством к фибрину, связывают в основном с фибринолитической системой, функцию у-АП — с рядом внутриклеточных и внеклеточных процессов, в том числе с миграцией и инвазией клеток [7, 14, 21, 33, 40]. Большинство опухолей секретируют у-АП, некоторые — т-АП, а в ряде случаев наблюдается продукция обоих типов АП [14, 21, 33, 40]. Индукция синтеза у-АП отмечалась при заражении ряда типов клеток ретровирусами, трансфекции онкогенов *src* и *ras*, под влиянием многих ростовых факторов, промоторов роста, некоторых гормонов [10, 14, 33]. В эмбриональных куриных фибробластах синтез увеличивался примерно в 50 раз и отмечался в течение 1 ч после заражения клеток еще до того, как они приобретали трансформированный фенотип [10, 14]. Установлено, что экспрессия гена у-АП находится под прямым контролем продукта гена *src* — белка $p60^{src}$ — и зависит от величины его протеинкиназной активности [10]. у-АП секретируется из клеток в виде неактивной одноцепочечной формы про-у-АП, которая под влиянием каталитических количеств плазмина (или автокаталитической реакции при связывании с рецептором) превращается в двухцепочечный активный фермент [7, 14, 33]. На плазматической мембране многих клеток находится специфический рецептор для у-АП, который связывает как активный фермент, так и про-у-АП (последний при этом может активироваться) [7, 14, 33]. Различные клетки синтезируют и секретируют в среду три разных типа ингибиторов АП [33, 64]. Они блокируют АП, но не взаимодействуют с у-АП, связанным с рецептором. Таким образом,

на мембране клетки может возникать участок, где локально повышена протеолитическая активность. Это, как полагают, имеет место в зоне фокального контакта [44, 48] и, поскольку АП активен при физиологических значениях рН, может иметь важные биологические последствия.

Каковы функции АП и какова его роль в процессах трансформации клетки? Полагают, что у-АП может быть включен как в изменение регуляции процессов пролиферации, так и в формирование трансформированного фенотипа клетки, а также в последующие стадии прогрессии опухоли, связанные с инвазией, миграцией клеток, метастазированием [7, 12, 14, 21, 33, 40, 64]. Действие у-АП может быть как непосредственным, так и опосредованным через плазмин, который образуется под влиянием АП из плазминогена. у-АП обладает митогенным свойством, которое, как полагают, может быть связано или не связано с его протеолитической активностью. В последнем случае митогенный эффект может быть индуцирован взаимодействием у-АП (за счет домена, гомологичного эпидермальному фактору роста) с рецептором [7, 33]. Протеолитическая реакция, приводящая к индукции пролиферации, не идентифицирована. у-АП сам или под действием образующегося при его участии плазмина может модифицировать белки плазматической мембраны и цитоскелета клетки и таким образом, изменяя антигенную структуру и морфологию клетки, может быть включен в формирование трансформированного фенотипа [7, 14, 21, 33, 40, 64]. Какие конкретные реакции протекают при этом, пока неизвестно. Велика роль АП во внеклеточном протеолизе, который является одним из основных медиаторных механизмов процессов инвазии и метастазирования, а также нарушения гемостаза, наблюдаемого при злокачественном росте [1, 7, 21, 64].

Цистеиновые протеиназы: катепсины В и L. На ранних стадиях трансформации клеток наблюдается появление не только АП, но и некоторых других протеиназ, в частности катепсина L. Это основная цистеиновая эндопептидаза лизосом с широким спектром действия и оптимумом рН в слабокислой среде — рН 6,0—6,5. Наряду с деградацией белков катепсин L катализирует ряд реакций ограниченного протеолиза и в модельных системах вызывает активацию ряда ключевых ферментов обмена (некоторых протеинкиназ, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов), инактивацию некоторых ферментов углеводного обмена и др. [5]. Фермент участвует в процессинге антигенов [38], образовании и инактивации некоторых регуляторных пептидов [5]. Кроме того, катепсин L расщепляет различные компоненты межклеточного матрикса: коллаген, эластин, фибронектин, ламинин, протеогликан — и может участвовать в деструкции ткани [5, 6]. Интерес к катепсину L и его роли в процессах онкогенной трансформации вызван тем, что в 1986—1987 гг. было установлено, что основной белок, секретируемый трансформированными мышинными фибробластами (так называемый МЕР), является проформой катепсина L [15, 19, 37]. Индукция синтеза МЕР наблюдается под действием ретровирусов, промоторов роста, некоторых ростовых факторов и химических канцерогенов

[19, 62]. После трансфекции онкогена *gas* в куриные фибробласты экспрессия МЕР увеличивается в 25—30 раз и отмечается в течение 1-го часа [17, 62]. Поскольку разные трансформирующие агенты вызывали экспрессию гена, кодирующего МЕР, было высказано предположение, что МЕР может являться маркером трансформации мышинных фибробластов [62]. Однако сама по себе повышенная продукция МЕР не вызывает образования трансформированного фенотипа [62]. Исследование свойств МЕР, структуры его гена и регуляции активности показало, что он является прокатепсином L [15, 19, 31, 37]. Белок обладает небольшой энзиматической активностью и может активироваться в кислой среде в результате автокаталитической реакции, превращаясь в катепсин L, аналогичный ферменту, находящемуся в лизосомах [37]. Увеличение синтеза прокатепсина L при трансформации фибробластов происходит, очевидно, в результате активации того же гена, который кодирует этот белок в нормальных клетках [31, 37, 62]. Повышенная секреция прокатепсина L связана с нарушением его гликозилирования и понижением сродства к рецептору для маннозо-6-фосфата [17].

Увеличение синтеза прокатепсина L отмечалось не только в трансформированных фибробластах, но и в ряде опухолей человека и липих раковых клеток [10, 31, 36, 70]. На клетках меланомы было показано, что катепсин L не только присутствует в лизосомах, но и экспрессируется на плазматической мембране, где он находится как в активной форме, так и в проформе. Содержание фермента в мембранной фракции коррелировало с метастатическим потенциалом отдельных субпопуляций клеток меланомы [55]. Аналогичные данные были получены ранее на том же материале еще для одной цистеиновой протеиназы — катепсина В [58].

Увеличение активности катепсина В — лизосомной протеиназы, основные функции которой связаны с участием в деградации и процессинге белков [5], отмечалось при разных формах неоплазий [49, 57]. В ряде случаев (при карциноме грудной железы, легких, меланоме и др.) наблюдалась секреция аномальной формы этого фермента [48, 57, 58]. Указанная катепсин В-подобная протеиназа находилась в латентной форме и отличалась от катепсина В стабильностью в нейтральной и слабощелочной среде [49, 57]. Она была идентифицирована как предшественник катепсина В, который, не подвергшись полностью протеолитическому процессингу, секретируется из клетки [57, 58]. На клетках мышинной меланомы было показано, что увеличение содержания катепсина В и появление его на плазматической мембране связаны не только с повышенной экспрессией гена, кодирующего этот белок в нормальных клетках, но и с активацией двух других генов [50].

Каковы функции катепсинов В и L в процессах канцерогенеза, пока не совсем ясно. Полагают, что, экспрессируясь на плазматической мембране раковой клетки и (или) секретирясь из нее, эти протеиназы участвуют в процессах инвазии и метастазирования [55, 58]. Вместе с тем высказывается мнение, что эти ферменты (особенно ка-

тепсин L) могут быть включены в начальные этапы онкогенной трансформации клетки [31]. Серьезным аргументом в пользу этого предположения являются опубликованные в 1987 г. данные о том, что продукт онкогена *ras* — белок p21 — обладает способностью ингибировать цистеиновые протеиназы [24]. Подобной активности пока ни для одного другого онкобелка не обнаружено [4, 9]. Белок p21 обладает большим сродством к катепсину L, чем к катепсину B, и эффективно тормозит ряд катализируемых этим ферментом реакций, в том числе расщепление регуляторной субъединицы ц-АМФ-зависимой протеинкиназы II [25] и деградацию рецептора для фактора роста эндермиса [26]. Каково значение модификаций этих (или других) протеолитических реакций для трансформирующего действия белка p21, пока сказать трудно. Можно, однако, думать, что биологические функции этого белка и его роль в трансформации клетки связаны не только со способностью связывать гуаниновые нуклеотиды, активностью ГТФазы и предполагаемым участием в цепи реакций передачи сигнала с поверхности клетки [4, 9], но и с нарушением «иротеолитического статуса» клетки [27]. В пользу этого указывают опыты с мутантными белками p. В этих опытах не удалось выявить прямой корреляции между трансформирующим действием этого белка и его гуаниннуклеотидсвязывающей и активирующей ГТФазу активностью, с одной стороны, и ингибиторными свойствами — с другой [27]. Вместе с тем ингибиторная активность p21, по-видимому, важна для процесса трансформации клетки, так как добавление к культуре фибробластов ингибиторов цистеиновых протеиназ (природных цистатинов или синтетических ингибиторов катепсина L) приводит к появлению локальных зон трансформации [29].

Представленные данные позволяют думать, что на начальных этапах трансформации клеток может нарушаться баланс цистеиновых протеиназ и их ингибитора, что может способствовать дестабилизации клетки. Это согласуется с гипотезой о дестабилизирующем и дерегулирующем механизмах действия онкогена *ras* в процессе трансформации [28, 43].

Хотя роль катепсинов L и B в процессах онкогенеза еще неясна, очевидно, что трансформация многих типов клеток сопровождается изменением уровня активности и регуляции этих лизосомных протеиназ: их повышенной экспрессией, нарушением процессинга и локализации. Является ли это причиной или следствием превращения нормальной клетки в трансформированную, покажут будущие исследования.

Аспаргильные протеиназы: катепсин D. Увеличение продукции, нарушение процессинга и гиперсекреция отмечались в процессах онкогенеза не только для лизосомных цистеиновых протеиназ (катепсинов B и L), но и для катепсина D. Высокомолекулярная форма этого фермента (52 кД) была обнаружена при раке грудной железы и эндометрия [53, 54]. Эстрогены и некоторые факторы роста индуцировали синтез этого белка и его повышенную секрецию из клетки. Было установлено, что указанный белок является прокатепсином D, который по своей первичной

структуре не отличается от соответствующего белка, синтезируемого нормальными эпителиальными клетками грудной железы (наблюдалась замена только одной аминокислоты [53, 54]). Эти данные, а также исследование соответствующих мРНК позволили заключить, что повышенный синтез прокатепсина D в раковых клетках обусловлен активацией гена, кодирующего этот белок в норме [54]. Выяснение причин повышенной секреции прокатепсина D привело к заключению, что в клетках рака грудной железы изменено гликозилирование белка, вследствие чего нарушены взаимодействие его с рецептором для маннозо-6-фосфата, транспортирующего белок в лизосомы, и его протеолитический процессинг [13]. Прокатепсин D в кислой среде в результате автокаталитической реакции превращается в активный фермент (с мол. м. 48 и 34 кД) [53]. В опытах *in vitro* прокатепсин D и образующийся из него фермент выступают как аутокринные митогенные факторы, усиливая пролиферацию клеток рака грудной железы [53, 54]. Поскольку в кислой среде (рН около 4,0) катепсин D вызывает деградацию компонентов межклеточного матрикса, полагают, что он может вносить вклад в инвазивную активность клеток [54]. Подтверждением этого могут служить данные о том, что высокое содержание катепсина D и его проформы в клетках рака грудной железы коррелирует с плохим прогнозом заболевания [60, 61]. Еще одна функция катепсина D в процессах злокачественного роста может быть связана с образованием и накоплением асцитной жидкости, так как он катализирует образование лейकोкининов, вызывающих увеличение проницаемости стенок сосудов [22]. В асцитной жидкости катепсин D может активировать также и латентную катепсин В-подобную протеиназу и тем самым усиливать течение процесса [45].

Металлопротеиназы: коллагеназы, стромелизин. В отличие от рассмотренных выше протеиназ, функции которых в процессах злокачественного роста могут быть связаны как с внутриклеточным, так и с внеклеточным протеолизом, металлопротеиназы — коллагеназы и стромелизины — участвуют во внеклеточной деструкции тканей. Они, по-видимому, ассоциированы с возникновением метастазирующего фенотипа клеток и играют ключевую роль в процессах инвазии и метастазирования [34, 35, 64, 68].

Особое внимание исследователей обращено на коллагеназу IV типа, которая разрушает коллаген базальных мембран, представляющих собой естественную преграду для инвазирующих клеток [6, 34, 35, 64]. Этот фермент был обнаружен в метастазирующих опухолях разного генеза, а в опытах с трансфекцией отдельных онкогенов в фибробласты и гибридизацией соматических клеток была показана корреляция его экспрессии и возникновения метастазирующего фенотипа клеток [20, 34, 35]. Многие опухоли характеризуются также повышенной продукцией коллагеназы I типа, гидролизующей интерстициальные коллагены — основные компоненты экстрацеллюлярного матрикса и соединительной ткани [6, 34, 64, 68]. С онкогенной трансформацией ряда типов клеток (например, эмбриональных крысиных фибробластов или фибробластов кожи

человека) ассоциирована экспрессия еще одной металлопротеиназы — стромелизина, которая расщепляет различные компоненты матрикса: протеогликаны, фибронектин, денатурированный коллаген I типа, коллаген IV типа [42, 67]. Все перечисленные металлопротеиназы секретируются из клетки в виде неактивных проферментов и могут активироваться в результате ограниченного протеолиза под действием ряда протеиназ [6, 23, 33, 34, 41, 64]. Существенную роль в этих процессах играет, очевидно, плазмин, который активирует проколлагеназу I и IV и простромелизин [7, 23, 33, 64]. При анализе некоторых линий раковых клеток (мышинной меланомы, рака легкого и поджелудочной железы человека) во фракции плазматических мембран было обнаружено высокое содержание металлопротеиназ, деградирующих коллаген. Изменение локализации указанных ферментов, по мнению авторов, может быть характерно для раковых клеток [71]. Многие клетки и ткани синтезируют ингибиторы металлопротеиназ, которые относятся к двум основным типам и обозначаются как тканевые ингибиторы металлопротеиназ I и II; они играют первостепенную роль в регуляции активности этих ферментов [34, 59, 64].

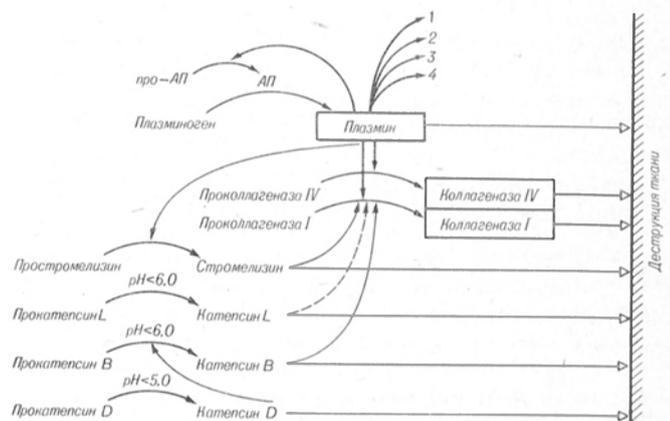
Названные выше металлопротеиназы могут образовываться не только раковыми клетками, но и близлежащими клетками нормальной соединительной ткани; будучи стимулированными раковыми клетками, они синтезируют и секретируют в среду большое количество проколлагеназы I и простромелизина, которые вовлекаются затем в деструкцию ткани [23, 34, 64, 68].

Протеиназы в процессах инвазии и метастазирования

Перечисленные выше протеиназы, а также ряд других участвуют в деструкции тканей в процессах инвазии и метастазирования — сложных биологических процессах, реализуемых координированными и многообразными взаимодействиями раковых клеток с клетками нормальных тканей и компонентами межклеточного матрикса [33—35, 43, 64]. В ходе «метастатического каскада» раковая клетка отделяется от первичной опухоли, преодолевает тканевые барьеры и базальные мембраны, попадает в кровоток или лимфатические сосуды, распространяется по организму, затем имплантируется в стенку капилляров, проникает в нормальные ткани и дает рост вторичной опухоли — метастазу [33, 57]. На всех этапах, каждый из которых осуществляется каскадом биохимических реакций, участвуют протеолитические ферменты. Необходимая для освобождения раковой клетки локальная деструкция ткани протекает, по-видимому, в перичеллюлярной области непосредственно около поверхности инвазирующей клетки [33, 34, 44, 55, 58]. Полагают, что в процессе инвазии раковая клетка, прикрепляясь за счет рецепторов для фибронектина и ламинина к соответствующим гликопротеинам экстрацеллюлярного матрикса или базальных мембран, начинает секретировать большое количество гидролитических ферментов и (или) стимулирует к секреции соседние клетки

нормальных тканей. Ферменты, действуя непосредственно на компоненты матрикса (фибронектин, ламинин, протеогликаны, коллаген) или активируя другие протеолитические ферменты (коллагеназы, стромелизин и др.), вызывают лизис тканей и способствуют проникновению в них раковой клетки [34]. Существенная роль в этих процессах принадлежит находящимся на поверхностной мембране раковой клетки протеиназам, которые резистентны к действию ингибиторов и создают локальные зоны с повышенной протеолитической активностью [33, 44, 48, 55, 58]. Среди них особое место занимает у-АП, индукция синтеза которого и экспрессия на мембране важны для инвазии и миграции клеток [7, 12, 33, 44, 48]. Катализируя образование плазмина, АП запускает каскады протеолитических реакций, которые медируются в дальнейшем плазмином и приводят в конечном счете к разрушению ткани, а также к активации различных систем плазмы крови, включенных в регуляцию гемостаза [7, 23, 33, 41, 64] (см. рисунок).

Каскады реакций, приводящие к деструкции ткани при инвазии клеток, могут быть индуцированы и другими протеиназами, в частности катепсинами В и L (см. рисунок). Эти ферменты не только сами разрушают компоненты матрикса, но и могут активировать латентные формы коллагеназы [6, 64]. Для активности катепсинов В и L оптимальной является слабокислая среда, вследствие чего их действие может быть ограничено. Однако подобные условия могут реализоваться в микроокружении раковой клетки, что будет способствовать локальному протеолизу [64]. Важно подчеркнуть, что, образовавшись в ничтожных количествах, у-АП или другая протеиназа-индуктор, может инициировать целый ряд биологических или патологических процессов, которые осуществляются в дальнейшем при участии плазмина и других протеиназ. В результате этого происходит резкое усиление и генерализация процесса, в осуществлении которого могут быть вовлечены разные типы клеток [6, 23, 64]. Степень участия разных протеиназ в инвазии различных клеток может различаться, она зависит как от типа опухоли, так и от конкретных



Взаимодействие протеиназ во внеклеточном протеолизе при деструкции ткани.

Протеиназы вырабатываются раковыми клетками или стимулированными клетками нормальных тканей. 1, 2, 3, 4 — фибринолитическая, свертывающая, калликреин-кининовая системы, система комплемента плазмы крови соответственно.

условий тканевого окруження. На это указывают данные о различном снижении инвазии клеток меланомы, фибросаркомы, карциномы при действии ингибиторов разных классов протеиназ [39, 52, 69]. Решающую роль в инвазии клеток играют, однако, металлопротеиназы, так как их ингибирование тормозит процесс примерно на 80 % [52, 56, 69].

Надо отметить, что образующиеся при деградации компонентов межклеточного матрикса (коллагена, фибронектина и др.) продукты распада во многих случаях обладают биологической активностью. Ряд из них являются хемотаксическими факторами и способствуют направленной миграции раковых клеток [3, 34, 64]. Некоторые из продуктов протеолиза фибронектина сами обладают протеолитической активностью [47] и, возможно, вносят вклад в последующую деструкцию ткани. Фрагменты фибронектина, имеющие митогенную активность, могут способствовать также пролиферации раковых клеток [3].

Таким образом, индуцированные протеолитическими ферментами внеклеточные каскады биохимических реакций имеют решающее значение в распространении и генерализации онкологического процесса.

Перспективы исследований протеиназ в клинике

С клинической точки зрения, исследования протеиназ, вырабатываемых раковыми клетками, могут иметь большую ценность, так как, как видно из изложенного, протеиназы могут являться маркерами инвазивной и метастатической активности опухоли. Крайне важными при этом являются выбор не только подходящего маркера, но и объекта для его исследования, а также специфичность метода определения. Присутствие большого числа различных ингибиторов протеиназ в сыворотке крови, других биологических жидкостях и тканях делает затруднительным прямое определение активности ферментов. Тем не менее в целом ряде работ были предприняты попытки определить активность протеиназ, вырабатываемых раковыми клетками, в сыворотке крови [2, 18, 41, 46, 65, 66]. В качестве субстратов для определения активности использовались низкомолекулярные флюорогенные или хромогенные синтетические пептиды, так как активность протеиназ по отношению к таким субстратам может сохраняться после взаимодействия с некоторыми ингибиторами. Такого рода исследования, направленные на обнаружение аномальной щелочно-стабильной катепсин В-подобной протеиназы, были проведены при разных формах рака: грудной железы [65], половых органов [46], печени, прямой кишки [18] и др. Хотя в ряде случаев активность фермента коррелировала с тяжестью онкологического процесса [46], такие исследования вряд ли перспективны. Это объясняется, во-первых, недостаточной специфичностью используемых субстратов, превращение которых могут катализировать также и другие протеиназы [2, 66] и, во-вторых, тем, что активность фермента в сыворотке может быть повышена и при иных патологических состояниях [2, 11, 40]. Последнее заключение относится также к коллагенолитиче-

ским ферментам, активность которых пытались определять в сыворотке крови при злокачественных новообразованиях [40, 41]. Более перспективными для диагностики представляются специфические иммунофлюоресцентные или радиоиммунологические методы, которые были применены недавно для определения у-АП [30], катепсина D [60, 61], катепсина В [32, 36], коллагеназы [11, 68]. С помощью моноклональных антител к у-АП и двух форм катепсина D (проформы и зрелого фермента) было установлено, что высокое содержание ферментов в клетках карциномы грудной железы коррелирует с частотой рецидивов и плохим прогнозом заболевания [30, 60, 61]. Проведенный ретроспективный многофакторный анализ показал, что у-АП [30] и катепсин D [60, 61] являются независимыми прогностическими показателями, которые лучше, чем другие тесты, отражают характер течения заболевания. Полагают, что определение содержания этих белков, а также некоторых других протеиназ (в том числе и коллагеназы) найдет широкое применение в клинической практике и может служить тестом при оценке эффективности проводимой терапии [7, 30, 60, 61]. Поскольку в опытах на экспериментальных животных специфические антитела к у-АП [7, 51], а также некоторые ингибиторы сериновых и металлопротеиназ [52, 56] тормозили развитие метастазов, можно думать, что среди ингибиторов протеиназ и моноклональных антител к этим ферментам могут быть в дальнейшем найдены эффективные химиотерапевтические и иммунотерапевтические средства.

Говоря о клиническом значении определения протеиназ при злокачественных новообразованиях, надо отметить, что в многочисленных работах для оценки характера течения заболевания пытались и пытаются использовать показатели фибринолитической, свертывающей, калликреин-кининовой систем, а также определение уровня ингибиторов протеиназ плазмы крови [1, 7, 63, 65]. Поскольку при злокачественном росте, особенно при генерализации процесса, происходит нарушение указанных систем, эти тесты, возможно, могут иметь определенную прогностическую значимость. Однако они являются неспецифичными и могут иметь лишь вспомогательное значение.

Заключение. Рассмотрим изложенные данные с двух точек зрения: каковы механизмы изменения активности и регуляции протеиназ при онкогенной трансформации клеток; каковы последствия нарушения «протеолитического статуса» клетки для последующих стадий канцерогенеза и развития патологического процесса.

Приведенные данные показывают, что увеличение активности протеиназ, сопровождающее неопластическую трансформацию многих типов клеток, обусловлено не только усилением биосинтеза ферментов, но и нарушением регуляции их активности, т. е. активность протеиназ при онкотрансформации контролируется и на генном, и на постгенном уровне. Усиленная экспрессия определенных протеиназ на той или иной стадии трансформации клетки может быть вызвана как активацией гена, кодирующего фермент в нормальной клетке (например, катепсины L

[31, 62] и D [53]), так и включением «молчащих» генов (коллагеназа IV [34], катепсин В [50]. Определенные стадии трансформации клетки: нарушение контроля роста, образование опухолевого фенотипа, появление метастазирующего фенотипа — ассоциированы, по-видимому, с экспрессией различных протеиназ. Их появление зависит от типа трансформируемой клетки, стадии ее дифференцировки и клеточного цикла, а также природы трансформирующего агента.

В случае лизосомных протеиназ (катепсинов В, L, D) усиленный биосинтез в различных опухолях сопровождается нарушением посттрансляционного процессинга предшественника ферментов: снижением гликозилирования и нарушением протеолитических стадий. В результате этого изменяется локализация протеиназ в клетке и наблюдается секреция неактивной или малоактивной проформы фермента. Изменение локализации лизосомных и некоторых других протеиназ [71], появление их на плазматической мембране раковых клеток и нарушение взаимодействия с соответствующими эндогенными ингибиторами приводят к возникновению локальных зон с повышенной протеолитической активностью [44, 48, 58]. Это в свою очередь может индуцировать различные реакции и модифицировать ряд внутриклеточных и внеклеточных процессов.

Хотя роль протеиназ в начальных этапах онкогенеза еще неясна, можно думать, что, экспрессируясь на ранних стадиях трансформации, эти ферменты вовлекаются в перестройки обмена и, инициируя каскады реакций, способствуют усилению пролиферации и формированию трансформированного фенотипа клетки. Появление несбалансированной протеолитической активности может оказывать дестабилизирующее действие на клетку, облегчая протекание последующих стадий трансформации. Экспрессия протеиназ на плазматической мембране раковых клеток и секреция их в перичеллюлярную область могут вызвать модификацию клеточной поверхности и изменение антигенных и адгезивных свойств клетки. Это в свою очередь приводит к нарушению межклеточных контактов, изменению иммуногенных свойств и возникновению иммунорезистентности раковых клеток по отношению к защитным системам организма-хозяина.

Реализуемые кооперированным взаимодействием различных протеиназ, вырабатываемых не только раковыми, но и стимулированными нормальными клетками, процессы локальной деструкции обеспечивают инвазию и метастазирование опухоли и распространение онкологического процесса. Совокупность представленных данных позволяет заключить, что, экспрессируясь на определенных стадиях онкогенной трансформации, протеиназы выступают затем как медиаторы последующих стадий, способствуя генерализации злокачественного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веремсенко К. П., Голобородько О. П. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 6. — С. 17—25.
2. Дилакян Э. А., Локишина Л. А., Молодык А. А. и др. // Там же. — 1989. — № 1. — С. 131—136.
3. Златопольский А. Д. // Вестн. АМН СССР. — 1991. — № 2. — С. 36—42.
4. Киселев Ф. Л., Павлиц О. А., Татосян А. Г. Молекулярные основы канцерогенеза у человека. — М., 1990.
5. Локишина Л. А., Дилакян Э. А. // Молекул. биол. — 1986. — № 5. — С. 1157—1175.
6. Локишина Л. А., Соловьева И. И., Орехович В. И. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 5. — С. 38—43.
7. Лягинский А. В., Егоров Б. Б. // Вопр. онкол. — 1989. — № 12. — С. 1418—1425.
8. Мишин Ю. Б. // Актуальные вопросы этиологии и патогенеза опухолей. — М., 1982. — С. 68—74.
9. Фаворова О. О., Фролова Л. Ю., Праслов В. С. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. — 1986. — Т. 31, № 3. — С. 278—286.
10. Bell S., Brackenbury R., Leslie N. et al. // J. biol. Chem. — 1990. — Vol. 265, N 3. — P. 1333—1338.
11. Bergmann U., Michaelis J., Oberhoff R. et al. // J. clin. Chem. clin. Biochem. — 1989. — Vol. 27. — P. 351—359.
12. Cajot J.-F., Schleuning W. D., Medcalf R. et al. // J. Cell. Biol. — 1989. — Vol. 109, N 2. — P. 915—925.
13. Capony F., Rougeot C., Montcourrier P. et al. // Cancer Res. — 1989. — Vol. 49. — P. 3904—3909.
14. Danø K., Andreassen P. A., Grondahl-Hasen J. et al. // Advanc. Cancer Res. — 1985. — Vol. 44. — P. 139—266.
15. Denhardt D. T., Greenberg A. H., Egöm S. E. et al. // Oncogene. — 1987. — Vol. 2. — P. 55—59.
16. DiStefano J. F., Colto C., Lane B. et al. // Cancer Invest. — 1988. — Vol. 6, N 5. — P. 487—498.
17. Dong J., Preuse E., Sahagian G. // J. biol. Chem. — 1989. — Vol. 264, N 13. — P. 7377—7383.
18. Dufek V., Jirasek V., Kral V. et al. // Neoplasma. — 1985. — Vol. 32, N 1. — P. 51—54.
19. Gal S., Gottesman M. M. // J. biol. Chem. — 1986. — Vol. 261, N 4. — P. 1760—1765.
20. Garbisa S., Pozzatti R., Mushel R. J. et al. // Cancer Res. — 1987. — Vol. 47. — P. 1523—1528.
21. Goldfarb R. H. // Tumor Invasion and Metastasis / Eds. L. A. Liotta et al. — Hague, 1982. — P. 375—390.
22. Greenbaum L. M. // Proteases and Biological Control / Eds. E. Reich et al. — Cold Spring Harbor, 1975. — P. 223—228.
23. He C., Wilhelm S. M., Pentland A. P. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1989. — Vol. 86, N 8. — P. 2632—2636.
24. Hiwasa T., Yokoyama S., Ito J. M. et al. // FEBS Lett. — 1987. — Vol. 211, N 1. — P. 23—26.
25. Hiwasa T., Sakiyama S., Noguchi S. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1987. — Vol. 146, N 2. — P. 731—738.
26. Hiwasa T., Sakiyama S., Yokoyama S. et al. // FEBS Lett. — 1988. — Vol. 233, N 2. — P. 367—370.
27. Hiwasa T. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. — 1988. — Vol. 369, Suppl. — P. 239—241.
28. Hiwasa T., Sawada T., Sakiyama S. et al. // Ibid. — 1989. — Vol. 370, N 11. — P. 1215—1220.
29. Hiwasa T., Sawada T., Sakiyama S. // Carcinogenesis. — 1990. — Vol. 11, N 1. — P. 75—80.
30. Jänicke F., Schmitt M., Holtrieder A. et al. // Fibrinolysis. — 1990. — Vol. 4. — P. 69—78.
31. Joseph L. J., Chang L.-C., Stamenkovich D. et al. // J. clin. Invest. — 1988. — Vol. 81. — P. 1621—1629.
32. Keppler D., Fondaneche M., Dalet-Fumeron V. et al. // Cancer Res. — 1988. — Vol. 48, N 23. — P. 6955—6862.
33. Laiho M., Keski-Oja J. // Ibid. — 1989. — Vol. 49. — P. 2533—2553.
34. Liotta L. A., Rao C. N., Wewer U. M. // Ann. Rev. Biochem. — 1986. — Vol. 55. — P. 1037—1057.
35. Liotta L. A. // Ciba Foundation Symposium 141 "Metastasis". — Chichester, 1988. — P. 94—108.
36. Maciewicz R. A., Wardale R. J., Etherington D. et al. // Int. J. Cancer. — 1989. — Vol. 43, N 3. — P. 478—485.
37. Mason R. W., Gal S., Gottesman M. // Biochem. J. — 1987. — Vol. 248, N 2. — P. 449—454.
38. McCoy K., Gal S., Schwartz R. H. et al. // J. Cell Biol. — 1988. — Vol. 106. — P. 1879—1884.
39. Mignatti P., Robbins E., Rifkin D. B. // Cell. — 1986. — Vol. 47, N 4. — P. 487—498.
40. Mullins D. E., Rohrllich S. T. // Biochim. biophys. Acta. — 1983. — Vol. 695, N 3—4. — P. 177—214.
41. Nakajima M., Irimura T., Nicolson G. L. // Cancer Bull. — 1987. — Vol. 39, N 3. — P. 142—149.
42. Nicholson R., Marphy G., Breathnach R. // Biochemistry (Wash.). — 1989. — Vol. 28. — P. 5195—5203.
43. Nicolson G. // Cancer Res. — 1987. — Vol. 47, N 6. — P. 1473—1487.
44. Ossowski L. // J. Cell Biol. — 1988. — Vol. 107. — P. 2437—2445.

45. Pagano M., Capony F., Fochefort H. // C. R. Acad. Sci. Paris.— 1989.— Vol. 309, Ser. III.— P. 7—12.
46. Pietras R. J., Szego C. M., Mangan M. I. et al. // Obstet. Gynec.— 1978.— Vol. 52.— P. 321—327.
47. Planchensull T., Vidmar S. L., Imhoff J. M. et al. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler.— 1990.— Vol. 371, N 2.— P. 117—128.
48. Pöllänen J., Hedman K., Nielsen L. et al. // J. cell Biol.— 1988.— Vol. 106, N 1.— P. 87—95.
49. Poole A. R., Recklies A. D., Mort J. S. // Proteinases and Tumor Invasion / Eds. P. Strauli et al.— New York, 1980.— P. 81—95.
50. Qian F., Bajkowski A. S., Steiner D. T. et al. // Cancer Res.— 1989.— Vol. 49, N 17.— P. 4870—4875.
51. Quigley J. P., Sullivan L. M., DeMarinis C. M. et al. // Ciba Foundation Symp. 141 "Metastasis".— Chichester, 1988.— P. 94—108.
52. Reich R., Thompson E., Iwamoto Y. et al. // Cancer Res.— 1988.— Vol. 48.— P. 3307—3312.
53. Rochefort H., Capony F., Garcia M. et al. // J. cell. Biochem.— 1987.— Vol. 35.— P. 17—29.
54. Rochefort H., Cavaillès V., Augereau P. et al. // J. Steroid Biochem.— 1989.— Vol. 34, N 1—6.— P. 177—182.
55. Rozhin J., Wade R., Honn K. V. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1989.— Vol. 164, N 1.— P. 556—561.
56. Schultze R., Siberman S., Persky B. et al. // Cancer Res.— 1988.— Vol. 48, N 19.— P. 5539—5545.
57. Sloane B. F., Honn K. V. // Cancer Metastas. Rev.— 1984.— Vol. 3.— P. 249—263.
58. Sloane B. F., Rozhin J., Halford J. S. et al. // Exp. Cell Biol.— 1987.— Vol. 55.— P. 209—224.
59. Steller-Stevenson W. G., Brown P., Onisto M. et al. // J. biol. Chem.— 1990.— Vol. 265, N 23.— P. 13933—13938.
60. Tandon A. K., Clark G. M., Chamness G. C. et al. // New Engl. J. Med.— 1990.— Vol. 322, N 5.— P. 297—302.
61. Threpe S., Rochefort H., Garcia M. et al. // Cancer Res.— 1989.— Vol. 49, N 21.— P. 6008—6012.
62. Troen B. R., Ascherman D., Atlas D. et al. // J. biol. Chem.— 1987.— Vol. 263, N 1.— P. 254—261.
63. Troll W., Wiesner R., Frenkel K. // Advanc. Cancer Res.— 1987.— Vol. 49.— P. 265—283.
64. Tryggvason K., Hoyhtya M., Salo T. // Biochim. biophys. Acta.— 1987.— Vol. 907, N 3.— P. 191—217.
65. Vasishtha A., Baker P. R., Preece P. E. et al. // Europ. J. clin. Oncol.— 1984.— Vol. 20, N 2.— P. 197—202.
66. Vasishtha A., Baker P. R., Preece P. E. et al. // Anticancer Res.— 1988.— Vol. 8.— P. 785—790.
67. Wilhelm S., Collier I., Kronberger A. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1987.— Vol. 84, N 19.— P. 6725—6729.
68. Woolley D. E., Tellow L. C., Mooney C. J. et al. // Proteinases and Tumor Invasion / Eds. P. Strauli et al.— New York, 1980.— P. 97—115.
69. Yagel S., Warner A., Nelans H. et al. // Cancer Res.— 1989.— Vol. 49, N 13.— P. 3553—3557.
70. Yamaguchi N., Chung S., Shiroeda O. et al. // Ibid.— 1990.— Vol. 50.— P. 658—663.
71. Zucker S., Wieman J. M., Lysik R. M. et al. // Ibid.— 1987.— Vol. 47, N 6.— P. 1608—1614.

Поступила 18.03.91

© Э. В. ДЯТЛОВИЦКАЯ, 1991

УДК 616-006.04-07:616.153.952-074

Э. В. Дятловицкая

ГЛИКОСФИНГОЛИПИДЫ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЙ РОСТ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шенякина
АН СССР, Москва

Гликофинголипиды (ГСЛ) — обязательные компоненты всех эукариотических клеток. В структуру молекулы ГСЛ входит аполярная часть — церамид, состоящий из сфингозина и остатка жир-

ной кислоты, и полярная углеводная цепь. В состав олигомерных углеводных цепей в качестве мономеров могут входить глюкоза, галактоза, фукоза, глюкозамин, галактозамин и сиаловые (N-ацилнейраминозные) кислоты. ГСЛ, содержащие сиаловые кислоты, называются ганглиозидами [41]. Клеточные ГСЛ в основном локализованы на внешней поверхности плазматической мембраны, причем керамидная (гидрофобная) часть погружена в мембрану, а углеводная (полярная) цепь направлена в окружающую среду. Хотя содержание ГСЛ составляет менее 1% от общей суммы клеточных липидов, во внешнем слое плазматической мембраны доля ГСЛ доходит до 50% от всех липидов.

Многочисленными исследованиями установлено, что ГСЛ проявляют иммуногенные свойства [10] и участвуют в процессах клеточного узнавания, рецепции гормонов, токсинов, факторов роста, лейкинов, в регуляции роста и дифференцировки клеток [12, 16, 32].

Существует определенная специфичность состава ГСЛ, в частности ганглиозидов, для различных органов и тканей. Изменение состава ГСЛ приводит к нарушению ряда биологических процессов, характерных для клеток. В настоящее время известно, что при злокачественном росте происходят значительные изменения в биосинтезе, катаболизме, составе и локализации ГСЛ [16, 18, 19]. Эти изменения обусловлены, с одной стороны, блокированием гликозилтрансфераз, что приводит к упрощению структуры углеводных цепей ГСЛ; с другой стороны, изменение состава ГСЛ сопровождается индуцированием биосинтеза (неосинтеза), что приводит к появлению новых гликолипидных компонентов, несвойственных клеткам гомологических нормальных тканей. Например, в ряде карцином появляются гликолипиды, содержащие фукозу [5, 16, 19]. В последние годы опубликовано значительное количество данных об опухолевых антигенах гликолипидной природы [5, 17—19].

Существенным фактором, отмечаемым при злокачественных заболеваниях, является резкое увеличение содержания ганглиозидов в сыворотке крови больных раком по сравнению со здоровыми донорами [22, 27, 34, 37, 40]. В 1 мл нормальной сыворотки крови присутствует около 20 нмоль липидно-связанных сиаловых кислот, в то время как у больных оно может достигать 50 нмоль/мл. Этот факт послужил основанием для создания диагностического теста [26]. Следует отметить, что после удаления опухоли уровень ганглиозидов в сыворотке нормализуется. Однако установлено, что изменяется не только содержание ганглиозидов, но также и их состав в сыворотке крови. В нормальной сыворотке крови человека основным ганглиозидным компонентом является GM₃. Ганглиозиды с другим строением углеводной цепи присутствуют в незначительных количествах [28]. В то же время в сыворотке крови пациентов с меланомой и пейробластомой найдены ганглиозиды GD₃ [34, 42] и GD₂ [30, 38, 42, 47], являющиеся поверхностными антигенами этих опухолевых клеток. Ганглиозид GD₃ был обнаружен также в сыворотке крови пациентов с болезнью Ходжкина, карциномой прямой кишки, яичников [4], молочной железы и желудка [9]. В крови больных с ге-

патомай обнаружен ганглиозид GM₂ [21]. Резкое возрастание содержания минорных для нормальной сыворотки крови человека ГСЛ было обнаружено в асцитических жидкостях при разных формах рака. Так, в случае гепатомы и рака поджелудочной железы в асцитических жидкостях найдены в значительных количествах ганглиозиды GM₂ и GD₃, а также нейтральный гликолипид — параглобозид [43].

Каким образом несвойственные нормальной сыворотке крови ганглиозиды появляются при злокачественных заболеваниях? Известно, что с клеточной поверхности *in vivo* и *in vitro* происходит непрерывное спонтанное сбрасывание (шеддинг) мембранных фрагментов [14, 35]. При некоторых патологических состояниях, особенно при малигнизации, shedding значительно усиливается, причем сброшенные мембранные фрагменты обогащены по сравнению с плазматической мембраной опухолевыми антигенами. [36, 45]. Принимая во внимание, что в плазматических мембранах присутствует большое количество ГСЛ, можно предположить, что они поступают во внеклеточную среду в результате эксфолиации мембранных фрагментов. При изучении shedding ГСЛ *in vitro* на примере тимоцитов теленка [15], клеток лимфомы EL-4 [11], лимфомы УАС-1 [29], лимфомы 5176У [46], гепатомы [39] и саркомы 37 [8] мышей было показано, что действительно с поверхности клеток во внеклеточную среду сбрасывается большое количество ганглиозидов, причем shedding происходит весьма интенсивно. Таким образом, ганглиозиды, находящиеся на поверхности опухолевых клеток, могут переходить в кровотоки.

Циркулируя в кровотоке, ГСЛ способны взаимодействовать с иммунокомпетентными клетками. Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что ГСЛ, особенно ганглиозиды, являются иммуномодуляторами [5]. Так, в опытах *in vitro* неоднократно было показано, что ганглиозиды мозга подавляют активацию и дифференцировку В-клеток, вызываемую митогенами, угнетают стимуляцию Т-лимфоцитов лектинами и аллогенными клетками, причем супрессорный эффект специфически зависит от структуры олигосахаридных цепей. Поскольку в крови больных раком резко увеличивается содержание ганглиозидов GM₃ и GD₃ и их предшественника лактозилцерамида, важно было изучить их влияние на иммунный ответ. Проведенные нами исследования показали, что ганглиозид GM₃ практически не влияет на бласттрансформацию лимфоцитов человека, индуцированную фитогемагглютинином, тогда как ганглиозид GD₃ и лактозилцерамид заметно ингибируют активацию [7]. В то же время ганглиозид GM₃ стимулирует Т-супрессорную активность [7]. Установлено, что Т-супрессорную активность лимфоцитов стимулирует также лактон ганглиозида GM₃ [20], который обнаружен в меланомных клетках [33].

Нами было изучено также влияние ганглиозидов на цитотоксическую активность естественных киллеров. Было показано, что ганглиозиды GM₃, GD₃ и лактозилцерамид заметно ингибируют цитотоксическую активность естественных киллеров мышей, в то время как ГСЛ с иной структурой углеводной цепи практически не оказывали влия-

ния [2]. Заметный ингибирующий эффект этих ганглиозидов был обнаружен также при их взаимодействии с естественными киллерами сирийских хомячков и человека [3, 6].

Все приведенные данные свидетельствуют о том, что при злокачественном росте наблюдается ряд отклонений в составе и содержании ГСЛ. Во-первых, существенно изменяется состав ГСЛ, что приводит к нарушению межклеточных контактов; эти изменения являются следствием нарушения биосинтеза ГСЛ. Во-вторых, усиление shedding мембранных компонентов, в том числе ганглиозидов, с поверхности опухолевых клеток приводит к повышению их содержания в сыворотке крови. В-третьих, присутствующие в сыворотке крови ганглиозиды могут модулировать противоопухолевый иммунитет организма, ингибируя цитотоксическую активность естественных киллеров, угнетая бласттрансформацию и активируя Т-супрессорную активность лимфоцитов.

Таким образом, при злокачественном перерождении нарушение биосинтеза ГСЛ в опухолевой клетке может приводить к подавлению противоопухолевого иммунитета организма.

Какие практические выводы можно сделать из приведенного выше материала?

В последние годы получены данные о том, что вакцинация пациентов с меланомой ганглиозидом GM₂ (антиген клеток меланомы) привела к образованию антител к GM₂ в организме и способствовала частичному рассасыванию опухоли [31]. Регрессия меланомы наблюдалась также при инъекции пациентам моноклональных антител к ганглиозиду GD₂ [11, 25] и GD₃ [13, 23, 24, 44].

Все приведенные результаты свидетельствуют о том, что исследование биосинтеза и состава ГСЛ при малигнизации клеток не только выявляет их изменение при злокачественном росте, но и приводит к разработке новых путей диагностики и терапии рака.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дятловицкая Э. В., Фомина-Агеева Е. В., Бергельсон Л. Д. // Докл. АН СССР.— 1983.— Т. 271.— С. 1511—1513.
2. Дятловицкая Э. В., Сеницына Е. В., Леменовская А. Ф., Бергельсон Л. Д. // Биохимия.— 1984.— Т. 49.— С. 432—436.
3. Дятловицкая Э. В., Ключарева Т. Е., Матвеева В. А. и др. // Там же.— 1985.— Т. 50.— С. 1514—1516.
4. Дятловицкая Э. В., Сомова О. Г., Новиков А. М. и др. // Там же.— С. 1933—1935.
5. Дятловицкая Э. В., Бергельсон Л. Д. // Успехи соврем. биол.— 1986.— Т. 102, № 4.— С. 51—64.
6. Дятловицкая Э. В., Матвеева В. А., Ключарева Т. Е. и др. // Докл. АН СССР.— 1987.— Т. 297.— С. 495—497.
7. Дятловицкая Э. В., Сускова В. С., Емец В. И. и др. // Иммунология.— 1987.— № 5.— С. 69—72.
8. Новиков А. М., Козлов А. М., Бассалык Л. С. // Бюл. экспер. биол.— 1986.— № 8.— С. 229—231.
9. Сомова О. Г., Текиева Е. А., Дятловицкая Э. В. и др. // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 2.— С. 21—23.
10. Alving C. R. // Antigens.— 1977.— Vol. 4.— P. 1—72.
11. Cheung N.-K., Lazarus H., Miraldi F. D. et al. // J. clin. Oncol.— 1987.— Vol. 5.— P. 1430—1440.
12. Curatolo W. // Biochim. biophys. Acta.— 1987.— Vol. 906.— P. 137—160.
13. Dippel W. G., Bernhard H., Dienes H. P., Meyer zum Buschenfelde K.-H. // Europ. J. Cancer.— 1988.— Vol. 24.— P. S65—S67.
14. Doljanski F. // Glycoconjugates.— 1982.— Vol. 4.— P. 155—187.
15. Dyallovitskaya E. V., Sinitsyna E. V., Yung K. et al. // Europ. J. Biochem.— 1983.— Vol. 131.— P. 601—605.

16. *Hakomori S.* // Ann. Rev. Biochem.—1981.— Vol. 50.— P. 733—764.
17. *Hakomori S.* // Ann. Rev. Immunol.—1984.— Vol. 2.— P. 103—126.
18. *Hakomori S.* // Chem. Phys. Lipids.—1986.— Vol. 42.— P. 209—233.
19. *Hakomori S.* // Advanc. Cancer Res.—1989.— Vol. 52.— P. 257—331.
20. *Harada Y., Sakatsume M., Taniguchi M.* // Jap. J. Cancer Res.—1990.— Vol. 81.— P. 383—387.
21. *Higashi H., Hirabayashi Y., Hirota M. et al.* // Ibid.—1987.— Vol. 78.— P. 1309—1313.
22. *Horgan I. E.* // Clin. chim. Acta.—1982.— Vol. 118.— P. 327—331.
23. *Houghton A. N., Mintzer D., Cordon-Cardo C. et al.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1985.— Vol. 82.— P. 1242—1246.
24. *Iliopoulos D., Ernst C., Steplewski Z. et al.* // J. nat. Cancer Inst.—1989.— Vol. 81.— P. 440—444.
25. *Irie R. F., Morton D. L.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1986.— Vol. 83.— P. 8694—8698.
26. *Katopodis N., Hirschaut Y., Geller N. L., Stock C. C.* // Cancer Res.—1982.— Vol. 42.— P. 5270—5275.
27. *Kloppel T. M., Keenan T. W., Freeman M. J., Morre D. J.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1977.— Vol. 74.— P. 3011—3013.
28. *Kundu S. K., Diego J., Osovitz S., Marcus D. M.* // Arch. Biochem.—1985.— Vol. 238.— P. 388—400.
29. *Ladisch S., Gillard B., Wong C., Ulsh L.* // Cancer Res.—1983.— Vol. 43.— P. 3808—3813.
30. *Ladisch S., Wu Z.-L., Feig S. A. et al.* // Int. J. Cancer.—1987.— Vol. 39.— P. 73—76.
31. *Livingston P. O., Natoli E. J., Calves M. J. et al.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1987.— Vol. 84.— P. 2911—2915.
32. *Makita A., Taniguchi N.* // Glycolipids / Ed. H. Wiegandt.—Amsterdam, 1985.— P. 1—99.
33. *Nores G. A., Dohi T., Taniguchi M., Hakomori S.* // J. Immunol.—1987.— Vol. 139.— P. 3171—3176.
34. *Portoukalian J., Zwingelstein G., Abdul-Malak N., Dore J. F.* // Biochem. biophys. Res. Commun.—1978.— Vol. 37.— P. 916—920.
35. *Price M. R., Baldwin R. W.* // Cell Surface Rev.—1977.— Vol. 3.— P. 423—471.
36. *Raz A., Goldman R., Yuli I., Inbar M.* // Cancer Immunol. Immunother.—1978.— Vol. 4.— P. 53—59.
37. *Saha S., Chattopadhyay U.* // Int. J. Cancer.—1988.— Vol. 41.— P. 432—435.
38. *Schulz G., Cheresh D. A., Varki N. M. et al.* // Cancer Res.—1984.— Vol. 44.— P. 5914—5920.
39. *Shaposhnikova G. I., Prokazova N. V., Buznikov G. A. et al.* // Europ. J. Biochem.—1984.— Vol. 140.— P. 567—570.
40. *Skipiski V. P., Katopodis N., Prendergast J. S., Stock C. C.* // Biochem. biophys. Res. Commun.—1975.— Vol. 67.— P. 1122—1127.
41. *Svennerholm L.* // J. Lipid Res.—1964.— Vol. 5.— P. 145—155.
42. *Tai T., Cahan I. D., Tsuchida T. et al.* // Int. J. Cancer.—1985.— Vol. 35.— P. 607—612.
43. *Taki T., Kojima S., Seto H. et al.* // J. Biochem.—1984.— Vol. 96.— P. 1257—1265.
44. *Vadhan-Raj S., Cordon-Cardo C., Carswell E. et al.* // J. clin. Oncol.—1988.— Vol. 6.— P. 1636—1648.
45. *Van Blitterswijk W. J., Emmelot P., Hilgers J. et al.* // Cancer Res.—1975.— Vol. 35.— P. 2743—2751.
46. *Young W. W. Jr., Borgman C. A., Wolock D. M.* // J. biol. Chem.—1986.— Vol. 261.— P. 2279—2283.
47. *Yamanaka T., Hirabayashi Y., Hirota M. et al.* // Biochim. biophys. Acta.—1987.— Vol. 920.— P. 181—184.

Поступила 18.03.91

© Н. К. БЕРДИНСКИХ, 1991

УДК 616-006-07:616-008.934.155

Н. К. Бердинских

ПОЛИАМИНЫ И ОПУХОЛЕВОЙ РОСТ

Институт проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР, Киев

В течение последних 20 лет проводятся интенсивные исследования роли полиаминов (путресцина, спермидина и спермина) при нормальном и злокачественном росте [1, 4, 5, 9]. Установлены их регуляторные функции в важнейших метаболических процессах, в частности в биосинтезе нуклеиновых кислот и белка, и важная роль в клеточной пролиферации.

Полиамины — эндогенные алифатические поликатионы: путресцин (1,4-диаминобутан), спермидин и спермин, рассматриваемые как производные путресцина, образующиеся в результате присоединения одной (в случае спермидина) или двух (в случае спермина) аминопропильных групп.

Механизм вовлечения полиаминов в процесс роста и деления клеток окончательно не выяснен. Однако не вызывает сомнения тот факт, что образование комплексов спермидина (или спермина) с нуклеиновыми кислотами и содержащими нуклеиновые кислоты надмолекулярными структурами (хромосомами, рибосомами и др.) — важнейшее условие обеспечения высокой скорости и надежности процессов транскрипции и трансляции.

Начиная с сообщения [7] о повышенном выведении полиаминов с мочой у онкологических больных эти вещества привлекли внимание исследователей как возможные маркеры злокачественного роста. В отделе биохимии опухолей Института проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР изучение полиаминов и ферментов их метаболизма проводилось на различных экспериментальных моделях опухолевого роста, а также у онкологических больных с солидными опухолями и системными заболеваниями крови.

Результаты исследований обнаружили характерные изменения метаболизма полиаминов при канцерогенезе и опухолевом росте у животных и человека. Так, при канцерогенезе печени, вызванном N-нитрозодиэтиламином, и при канцерогенезе кишечника, вызванном 1,2-диметилгидразином (ДМГ), в органах-мишенях наблюдаются активация синтеза и ослабление катаболизма полиаминов. В табл. 1 представлены данные об активности ключевого фермента биосинтеза полиаминов — орнитиндекарбоксилазы (ОДК) — в слизистой оболочке тонкого и толстого кишечника крыс в процессе канцерогенеза. У подопытных крыс в слизистой оболочке тонкого и толстого кишечника изменения активности ОДК сходны: период резкого ее увеличения в первый месяц канцерогенеза сменяется значительным ее снижением и последующим повторным повышением.

Выявленные изменения активности ОДК отражают фазовый характер пролиферации клеток крипт кишечника при введении канцерогенеза [6]. Первое повышение уровня активности ОДК в кишечнике в конце 1-го месяца канцерогенеза обусловлено компенсаторной регенерацией, разви-

Таблица 1

Активность ОДК (в нмоль $^{14}\text{CO}_2$ на 1 мг белка за 1 ч) в слизистой оболочке кишечника крыс при канцерогенезе, индуцированном ДМГ

Группа животных	Срок исследования, мес	Тонкий кишечник	Толстый кишечник
1-я (n=42)	1	73,56±12,45***	41,04±6,78***
	2	1,13±0,15**	1,04±0,15**
	3	5,44±0,58	12,15±2,43**
	4	8,85±0,60*	16,21±0,88*
	5	9,38±1,06*	25,68±6,96***
	6	64,68±5,30***	65,81±6,76***
2-я (n=8)	Опухоль	5,95±0,97	3,91±0,47

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$.

вающейся в слизистой оболочке в ответ на повреждающее действие канцерогенеза. При этом резкое увеличение активности ОДК может быть связано с повышением синтеза молекул фермента вследствие стимуляции транскрипции соответствующего гена ОДК протеинкиназой I [8]. Снижение активности ОДК к концу 2-го месяца канцерогенеза связано, вероятно, с действием защитных механизмов (скорее всего иммунологических), при участии которых трансформированные клетки устраниваются из эпителиального слоя [6]. Второе повышение активности ОДК соответствует периоду увеличенной пролиферативной активности измененных клеток слизистой оболочки. Максимальный пик активности ОДК обнаружен в опухолях кишечника.

Определение активности ОДК и содержание полиаминов в слизистой оболочке и опухолях желудочно-кишечного тракта человека (исследуемый материал был взят при операциях у 100 больных аденокарциномами желудочно-кишечного тракта). Обнаружено, что активность ОДК в злокачественных опухолях желудка и кишечника человека в среднем в 5 раз выше таковой в макроскопически неизменной слизистой оболочке, расположенной на расстоянии не менее 5 см от опухоли (табл. 2). Обнаружена обратная коррелятивная связь между величиной активности ОДК в аденокарциномах желудочно-кишечного тракта и степенью дифференциации. Общее содержание полиаминов в опухолях повышено в среднем в 1,6 раза по сравнению с макроскопически неизменной слизистой оболочкой. Это связано с увеличением абсолютного содержания всех фракций полиаминов, особенно путресцина и спер-

Таблица 2

Активность ОДК (в нмоль $^{14}\text{CO}_2$ на 1 мг белка за 1 ч) в слизистой оболочке (а) и опухолевой ткани (б) различных отделов желудочно-кишечного тракта

Отдел желудочно-кишечного тракта	Число образцов	Тип ткани	Активность ОДК
Желудок	36	а	6,57±0,77
		б	31,44±3,49*
Толстый и тонкий кишечник	25	а	6,59±1,10
		б	32,47±4,45*
Прямая кишка	34	а	7,00±0,87
		б	31,95±2,92*

Примечание. Звездочка — $p < 0,001$.

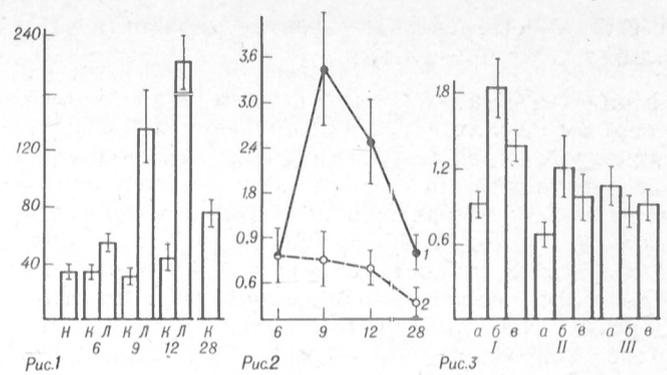


Рис. 1. Экскреция путресцина с мочой у крыс при росте опухолей.

II — норма; К — карцинома Герена; Л — лимфосаркома Плисса. По оси абсцисс — срок после перевивки опухолей, дни; по оси ординат — содержание путресцина, мкг/сут.

Рис. 2. Влияние циклофосфана на экскрецию полиаминов у крыс с карциномой Герена.

1 — циклофосфан вводили; 2 — циклофосфан не вводили. По оси абсцисс — срок после перевивки опухолей, дни; по оси ординат — спермидин/путресцин.

Рис. 3. Динамика изменения соотношения снд/пут в зависимости от типа ответа на лечение у больных раком яичников.

По оси абсцисс: период наблюдения (а — до лечения; б — в процессе лечения; в — после лечения); по оси ординат — спермидин/путресцин. Эффективность химиотерапии: I — весьма успешная, II — умеренно успешная, III — безуспешная.

мидина. Со снижением уровня дифференциации в опухолевой ткани отмечается тенденция к возрастанию общего содержания полиаминов в основном за счет фракции путресцина. Необходимо подчеркнуть, что концентрация путресцина в меньшей степени, чем величина активности ОДК, отражает уровень катаплазии аденокарцином.

Экспериментальное изучение опухолей с различной скоростью роста, в разные фазы развития и в условиях регрессии позволило сделать вывод, что активность ОДК и уровень полиаминов (особенно уровень путресцина и спермидина) отражают ее пролиферативную активность.

Рост опухоли приводит к накоплению полиаминов в организме-опухоленосителе, увеличивается содержание полиаминов в крови и их выведение с мочой из организма. Установлена прямая корреляция между уровнем путресцина в моче животных и скоростью роста первичных опухолей [2]. На рис. 1 представлены данные о содержании путресцина в моче крыс с медленно растущей (карцинома Герена, период развития 28—30 дней) и быстро растущей (лимфосаркома Плисса, период развития 12—14 дней) опухолью. У крыс с лимфосаркомой Плисса отмечено более высокое содержание путресцина в моче. Хирургическое удаление опухоли приводит к нормализации содержания полиаминов в крови и моче животных. Эффективная химио- или радиотерапия вызывает характерные изменения содержания полиаминов в моче: в первые сутки лечения уровень спермидина увеличивается в результате гибели опухолевых клеток, уровень путресцина снижается из-за подавления процесса клеточной пролиферации [10]. На рис. 2 демонстрируется подъем соотношения спермидин/путресцин (снд/пут) при эффективном лечении циклофосфаном крыс с карциномой Герена. Таким образом, определение величины экскреции спермидина и путресцина и расчет коэффициента снд/пут позволяют прогнозировать

эффективность действия химиопрепаратов в первые сутки их применения.

Нами изучена экскреция полиаминов с мочой у онкологических и неонкологических больных и у здоровых людей (около 1500 человек). Полученные результаты позволили нам рекомендовать этот тест для использования в комплексе диагностических методов обследования, а также для оценки эффективности лечения онкологических больных и прогноза заболевания. Практически здоровые люди выделяют за сутки от 2 до 10 мг полиаминов (в среднем 7,4 мг). У подавляющего большинства больных раком (у 75 % больных раком желудка и молочной железы, у 80 % больных раком легкого и раком тела и шейки матки, у 82 % больных злокачественными лимфомами, у 78 % больных раком яичников) выведение полиаминов с мочой увеличено в среднем в 2—5 раз (от 15 до 40 мг).

Количество полиаминов в моче онкологических больных изменяется при эффективном лечении. При успешной химиотерапии наблюдается значительное увеличение выведения спермидина с мочой в первые дни лечения с последующим снижением вплоть до нормализации к моменту выписки больного из стационара. Сохранение исходного уровня спермидина в моче или его снижение в первые дни лечения указывает на то, что опухоль нечувствительна к применяемому препарату. Оценку эффективности действия химиопрепаратов следует проводить, учитывая изменения величины соотношения спд/пут. Эта величина возрастает в первые дни лечения в случае, если применяемый химиопрепарат эффективен, и не изменяется или даже снижается, если препарат неэффективен.

На рис. 3 представлены величины соотношения спд/пут для трех групп больных раком яичников: с эффективным лечением, с частично эффективным лечением, с неэффективным лечением.

Результаты клинических исследований подтверждают экспериментальные данные и позволяют в ранние сроки после начала терапии прогнозировать ее эффективность с высокой степенью вероятности. При этом следует ориентироваться не на суммарное содержание полиаминов, а на абсолютные величины экскреции спермидина и путресцина и их соотношение. В первые дни эффективного лечения изменения экскреции спермидина и путресцина имеют разнонаправленный характер (спермидин — в сторону увеличения, путресцин — в сторону уменьшения), в результате чего суммарная величина их экскреции может существенно не изменяться.

Представляется перспективным использование результатов исследований экскреции полиаминов для прогнозирования заболевания при долгосрочном наблюдении за больными в интеркуррентном периоде, так как при ремиссии заболевания количество полиаминов в моче значительно ниже, чем при прогрессировании и возникновении рецидивов. В табл. 3 представлены данные об экскреции полиаминов у больных раком яичников в активной фазе заболевания (55 женщин) и при ремиссии (53 женщины). Обнаружены большие различия в экскреции всех полиаминов, особенно путресцина и спермидина. Содержание спермидина в сыворотке крови больных раком яичников при рецидивах (51 случай) было $7,25 \pm 0,37$ мкг/мл, а в период

Таблица 3

Содержание полиаминов (в мг/сут) в моче больных раком яичников ($M \pm m$)

Полиамин	Активность процесса	
	рецидив (n=55)	ремиссия (n=53)
Спермин	$3,33 \pm 0,25$	$2,11 \pm 0,14$
Спермидин	$8,45 \pm 0,63$	$5,77 \pm 0,3$
Путресцин	$9,6 \pm 0,7$	$4,19 \pm 0,25$
Сумма полиаминов	$22,22 \pm 1,11$	$11,98 \pm 0,51$
Соотношение спд/пут	$1,00 \pm 0,07$	$1,54 \pm 0,11$

ремиссии (18 женщин) — лишь $4,91 \pm 0,42$ мкг/мл. Аналогичные результаты получены при исследовании больных злокачественными лимфомами [3].

Мы считаем определение содержания полиаминов в моче более информативным по сравнению с определением их содержания в крови.

Таким образом, накопление полиаминов — характерная, хотя и неспецифическая, черта опухолевого роста. Мы считаем полезным определять полиаминовый статус (экскреция полиаминов с мочой, содержание их в крови) при первичном обращении больного в онкологическое учреждение, во время лечения для выбора эффективных химиопрепаратов в каждом конкретном случае и в дальнейшем для характеристики активности процесса и прогноза заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бердинских Н. К., Залеток С. П. Полиамины и опухолевый рост. — Киев, 1987.
2. Бердинских Н. К., Драга Н. В., Залеток С. П., Лялюшко П. М. // Экспер. онкол. — 1987. — № 6. — С. 62.
3. Драга Н. В., Бердинских Н. К., Киндзельский Л. П. и др. // Врач. дело. — 1983. — № 12. — С. 44—46.
4. Сяткин С. П., Березов Т. Т. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 3. — С. 10—21.
5. Advances in Polyamine Research / Eds. U. Bachrach, E. Kaye, R. Chaen. — New York, 1983.
6. Pozharisski K., Likhachev A., Klimashevski V., Shaposhnikov J. // Advanc. Cancer Res. — 1979. — Vol. 30. — P. 165—237.
7. Russel D. H., Levy C. C., Schimpff S. C. // Cancer Res. — 1971. — Vol. 31, N 11. — P. 1555—1558.
8. Russel D. // Advanc. Cyclic Nucl. Res. — 1978. — Vol. 9. — P. 493—506.
9. Russel D. H. // Biochemical Markers of Cancer. — New York, 1982. — P. 241—265.
10. Russel D. // Crit. Rev. Lab. Sci. — 1983. — Vol. 18, N 3. — P. 261—311.

Поступила 16.02.91

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 612.82:612.646].014.482.019:599.323.4

А. Э. Боровицкая, В. И. Евтушенко, К. П. Хансон

ДЕЙСТВИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО НЕЙТРОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ МОЗГЕ КРЫСЫ

Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт Минздрава СССР, Ленинград; НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова Минздрава СССР, Москва

Пренатальный период развития характеризуется активно протекающими процессами клеточной пролиферации и дифференцировки, нарушение равновесия между которыми может приводить к

тяжелым последствиям для развивающегося организма [4]. Не вызывает сомнения, что именно поэтому в процессе эволюции у всех видов животных сформировались системы защиты эмбриона от влияния вредных факторов окружающей среды. Они, однако, оказываются неэффективными в отношении ионизирующего излучения, обладающего выраженными генетическим тератогенным, и канцерогенным свойствами в пренатальном периоде [19].

В 1956 г. было впервые сообщено [24] о возрастании риска лейкозов и некоторых солидных опухолей у детей, подвергшихся облучению *in utero* при рентгенодиагностических процедурах, что нашло подтверждение в ряде последующих работ [8, 9, 16]. Наряду с этим существуют, однако, работы, в которых не обнаруживается канцерогенное действие пренатального облучения [10, 22]. Это противоречие, по-видимому, объясняется тем, что характер эффекта существенно зависит от стадии индивидуального развития организма и каждой конкретной ткани в момент радиационного воздействия [12]. Особенно высокой радиочувствительностью отличается развивающаяся нервная ткань. Так, облучение на 15—21-й день внутриутробного развития грызунов (8—15 нед беременности у человека) приводит к выраженным структурно-функциональным нарушениям головного мозга, проявляющимся в дефиците массы мозга в постнатальном онтогенезе [20]. Очевидно, поэтому одним из часто встречающихся последствий внутриутробного облучения детей в результате атомной бомбардировки Хиросимы и Нагасаки является микроцефалия и умственная отсталость [23].

В эксперименте на животных, подвергнутых облучению *in utero*, обнаружены глубокие нарушения ряда биохимических процессов в головном мозге: снижение синтеза гистонов и негистоновых белков [5], изменение активности ферментов холинэргической системы [13], нарушение транспорта ионов [26] и т. д. Клеточную основу наблюдаемого феномена составляет радиационная гибель незрелых нейробластов развивающегося головного мозга [5].

Несмотря на то что о нарушении развития мозга при внутриутробном облучении известно давно и феноменология его описана достаточно полно, молекулярные механизмы данного явления лишь только начинают исследоваться.

Исходя из изложенного, целью настоящей работы явилось изучение влияния пренатального гамма-нейтронного облучения на экспрессию группы транспецифических генов (GAP-43, NCAM, протеинкиназа С—ПКС, кальмодулин—КМ) и протоонкогенов (*c-fos*, *c-jun*, *c-myc*) в головном мозге крыс на протяжении длительного периода (до 1,5 лет) после рождения животных.

Методика. В экспериментах использовались белые беспородные крысы. Самки и самцы массой 200—300 г ссаживались на 1 сут (5 самок+1 самец). На 17-й день беременности крыс облучали в биологическом канале реактора ВВР-М (Ленинградский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова АН СССР) гамма-нейтронным излучением в суммарной дозе 0,5 Гр (вклад нейтронов 70%). Энергия нейтронов в разных сериях облучения составляла 0,7—1,0 МэВ.

Через определенные сроки после рождения (п. р.) облученных и контрольных крыс забивали и их мозг взвешивали. Результаты обрабатывали статистически с вычислением

критерия Стьюдента [2]. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Выделение тотальной клеточной РНК. Тотальную клеточную РНК выделяли методом [7]. Замороженную ткань мозга гомогенизировали в 5 М гуанидинтиоцианате из расчета 8 мл раствора на 1 г ткани. Гомогенат насливали на 20 мл 5,7 М раствора CsCl и центрифугировали в роторе SW-27 ультрацентрифуги L7-87 («Beckman», США) в течение 24 ч при 24 000 об/мин и 20 °С. РНК растворяли в воде и пересаждали 70% этанолом для удаления остатков гуанидинтиоцианата и CsCl.

Электрофорез и перенос РНК на капроновые фильтры. 5 мкг РНК денатурировали в 1 М глиоксале при 50 °С в течение 30 мин [25]. РНК разделяли на фракции в 1,1% агарозном геле, 20 мМ натрий-фосфатном буфере при 4 °С. После электрофореза РНК переносили на капроновые мембраны («Хийу Калур», СССР) путем капиллярного транспорта в 20-кратном SSC (однократный SSC — это 0,15 М NaCl, 0,01 М цитрат натрия, pH 7,0) и иммобилизовали на фильтре УФ-светом в течение 3,5 мин [15].

Гибридизация РНК. Фильтры с иммобилизованной РНК предгибридизовали в смеси следующего состава: 7% додецилсульфат натрия (ДСН), 0,15 М натрий-фосфат pH 7,0, 5 мМ ЭДТА при 60 °С в течение 16—20 ч. Гибридизацию фильтра с ³²P-мечеными пробами ДНК проводили в смеси того же состава в течение 36—48 ч при 60 °С и постоянном покачивании.

Получение меченых проб. ³²P-меченные пробы ДНК получали с помощью реакции нуклеотидации (стандартный набор фирмы «Amersham», Англия, и ³²P-меченные дезокси-нуклеотидтрифосфаты с удельной активностью более 11 ПБк/моль, ТМО «Изотоп», СССР).

Специфическая активность меченых проб была 0,5—2,0 × 10⁶ имп/мин/мкг.

В работе использовали полученные от авторов рекомбинантные плазмиды, содержащие интересующие нас гены: GAP-43 (GAP-ECO, к ДНК крысы [14]), NCAM (p5-16, к ДНК мыши [11]), протеинкиназа С (pUC 19, к ДНК из мозга крысы [17]), кальмодулин (pRCM 1, к ДНК крысы [19]), онкогены: *v-fos* (p fos-1, вирусный [21]), *v-jun* (p Jun, вирусный [6]), *c-myc* (pRM 1, геномная последовательность крысы [27]).

Фильтры отмывали от негибридизовавшихся проб в жестких условиях дважды (2 × SSC, 1% ДСН, 1 ч) и один раз в 0,1-кратном SSC, 1 ч, 65 °С. После отмывки фильтры экспонировали с рентгеновской пленкой (1S 11, ORWO, Германия) при —70 °С в течение 1—7 сут.

Для количественной оценки уровня транскриптов автордиограммы денситометрировали в «Bioned Scanning Densitometer» (США).

Результаты и обсуждение. В таблице приведены данные о динамике изменения массы мозга контрольных и пренатально облученных (ПНО) крыс. Дефицит массы мозга наблюдается уже у новорожденных облученных животных и достигает максимума через 3 нед п. р. В более отдаленные сроки (до 6 мес п. р.) дефицит массы мозга у ПНО животных не компенсируется. Следует отметить, что мозг 6-месячных животных значительно отличается от контрольного: он меньшего размера, в нем наблюдаются недоразвитие затылочной области коры больших полушарий и сглаженность извилин коры больших полушарий [1]. Для выяснения молекулярно-генетических событий, происходящих в клетках мозга ПНО животных, мы исследовали экспрессию двух групп

Динамика изменения массы головного мозга ПНО крыс п. р.

Время п. р., дни	Масса мозга, г		Дефицит массы мозга, %
	контроль	облучение	
1	0,22±0,01	0,18±0,03	18,2
7	0,63±0,02	0,39±0,01	38,1
14	1,14±0,01	0,72±0,02	36,9
21	1,47±0,02	0,85±0,03	42,2
28	1,54±0,05	0,97±0,03	37,1
60	1,78±0,03	1,19±0,05	33,2
90	1,87±0,03	1,29±0,05	31,1
180	2,13±0,07	1,34±0,07	37,1

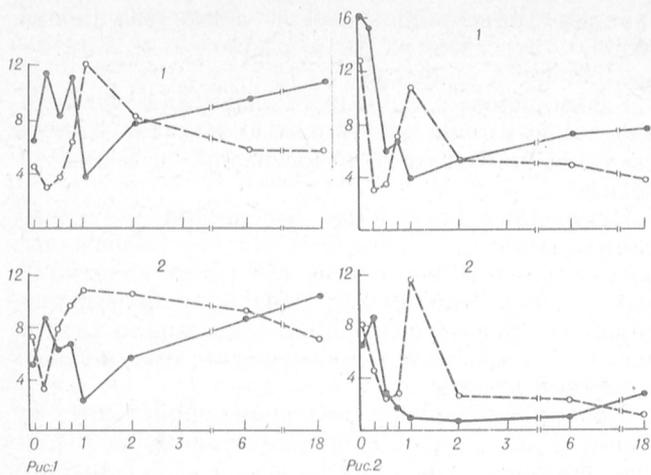


Рис. 1. Динамика экспрессии генов ПКС (1) и КМ (2) в мозге п. р.

По оси абсцисс — время п. р., мес; по оси ординат — единицы оптической плотности. Здесь и на рис. 2, 4, 5: сплошная линия — контроль, пунктирная — облучение.

Рис. 2. Динамика экспрессии генов NCAM (1) и GAP-43 (2) в мозге п. р.

генов: специфических нейрональных генов и protoонкогенов. В качестве примеров нейрональных генов были выбраны гены, кодирующие ПКС и КМ, экспрессия которых характеризуется высоким уровнем в первые 2—3 нед. п. р. с последующим снижением в период завершения функционального созревания мозга (рис. 1). Экспрессия других нейрональных генов (NCAM и GAP-43) высока у 1—7-дневных животных и снижается в процессе созревания мозга (рис. 2).

Интересно, что, несмотря на различия в динамике экспрессии нейрональных генов в раннем постнатальном онтогенезе, в коре мозга взрослых животных (6—18 мес) наблюдается высокий уровень транскриптов всех изученных генов. Возможно, это необходимо для реализации уникального свойства мозга — пластичности, т. е. способности к образованию новых и реорганизации существующих синаптических связей в течение жизни.

Следует отметить, что пренатальное облучение животных вызывает снижение уровня транскриптов нейрональных генов в раннем постнатальном онтогенезе (1—7 сут п. р.) (см. рис. 1, 2). В дальнейшем (3—4 нед п. р.) происходит активация экспрессии всех изученных генов. Она совпадает по времени с периодом завершения функционального созревания мозга в норме, а у облученных

животных с максимальной выраженностью дефицита массы мозга (3—4 нед п. р.). По-видимому, повышенный уровень экспрессии нейрональных генов в последнем случае (через 1 мес п. р.) отражает компенсаторные процессы в мозге, обусловленные пострадиационным дефицитом нервных клеток. Эти компенсаторные процессы морфологически проявляются в формировании дополнительных аксонных выростов, ветвлении дендритов и образовании новых синапсов. Подобное компенсаторное разрастание нервных отростков (спраутинг) продемонстрировано в ряде отделов головного мозга после хирургических вмешательств, приводящих к потере постсинаптических мишеней [3].

Наиболее выраженную пострадиационную активацию экспрессии изученных генов мы наблюдали в коре мозга. В других его отделах (продолговатый мозг, мозжечок, средний мозг) она была значительно менее выражена. Возможно, это связано с тем, что в момент облучения (17-й день *in utero*) в коре мозга происходит наиболее активная пролиферация и дифференцировка клеток, что обуславливает их высокую радиопоражаемость.

Важно отметить, что нейроны коры облученного мозга способны поддерживать высокий уровень транскрипции некоторых генов, характерный для взрослых контрольных животных до 6 мес п. р. (КМ), тогда как для других генов (NCAM, GAP-43, ПКС) наблюдается только кратковременная активация, продолжающаяся не более 1 мес. В последующие сроки уровень транскриптов гена GAP-43 не отличается от контроля, а генов NCAM и ПКС — даже ниже контрольных значений.

На рис. 3 можно видеть, что пострадиационная активация экспрессии гена ПКС сопровождается одновременными качественными изменениями синтеза мРНК этого гена. Так, в период 4 нед — 2 мес п. р. в коре мозга ПНО крыс выявляются транскрипты размером 3,4—3,7 т. п. н., которые вновь исчезают у 1,5-годовалых животных. В этот же период (4 нед п. р.) у облученных крыс отмечается повышение содержания высокомолекулярных (9,5 т. п. н.) специфических транскриптов гена ПКС.

Характерно, что в позднем ПН периоде (18 мес) практически во всех случаях в мозге облученных крыс отмечается снижение уровня экспрессии нейрональных генов. По-видимому, это отражает функциональную неполноценность клеток облученного мозга в отдаленный пострадиационный период.

В следующей серии экспериментов исследовали

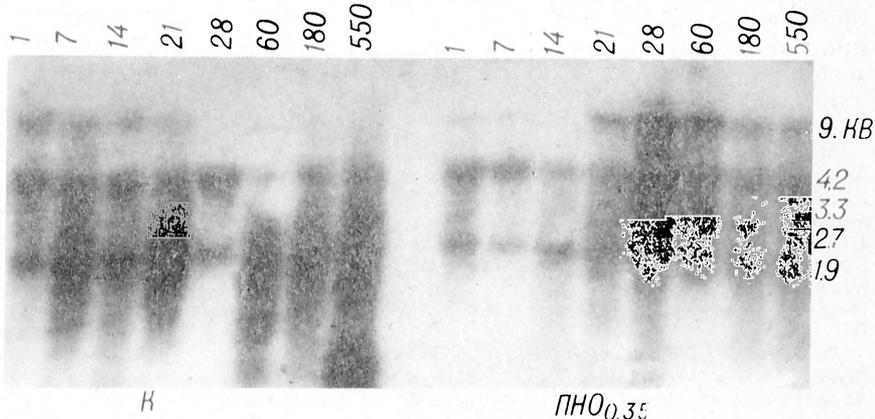


Рис. 3. Гибридизация РНК, выделенной из мозга контрольных (К) и ПНО крыс с ^{32}P -меченой плазмидой pUC19, содержащей вставку гена протеинкиназы С. Вверху — дни после рождения; справа — размер транскриптов гена протеинкиназы С, т. п. н.

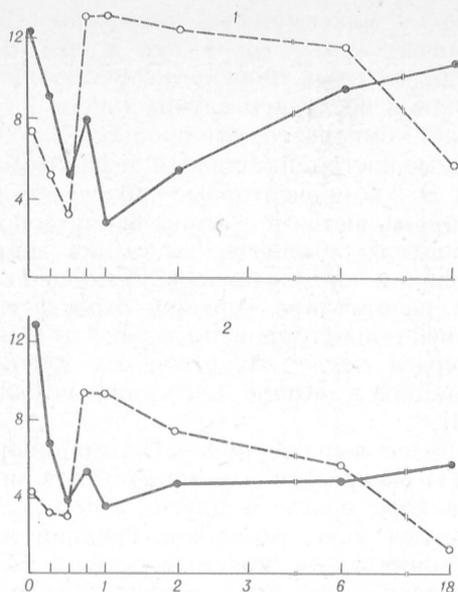


Рис. 4. Динамика экспрессии протоонкогенов *c-fos* (1) и *c-jun* (2) в мозге п. р.

экспрессию протоонкогенов *c-mas*, *c-fos* и *c-jun* в коре мозга контрольных и ПНО крыс.

В раннем постнатальном онтогенезе (до 1 мес) наблюдается двухфазный характер экспрессии протоонкогенов. Высокий уровень транскриптов у новорожденных животных, возможно, связан с продолжающейся в первые дни п. р. пролиферацией клеток, а также с дифференцировкой корковых нейронов. Второй пик экспрессии (у 3-недельных крыс) коррелирует с активизацией процессов созревания нервных связей в мозге (рис. 4, 5).

Сходство динамики экспрессии изученных протоонкогенов независимо от того, к какому классу они принадлежат (ядерные, цитоплазматические), предполагает существование их функциональной взаимосвязи. Действительно, продукты многих протоонкогенов и других клеточных генов взаимодействуют в процессе развития и функционирования нервных связей в мозге. Так, в трансдукции сигналов от гормонов, нейромедиаторов, факторов роста и других внешних стимулов через инозитол-липидный сигнальный путь принимают участие практически все изученные нейрональные гены и протоонкогены. Путем опосредованной активации ПКС и повышения содержания внутриклеточного Ca^{2+} включается цепь событий, приводящая к интеграции входных сигналов. Одним из конечных звеньев этой цепи является фосфорилирование ядерных белков, в том числе *c-fos* и *c-jun*. Это может приводить к ак-

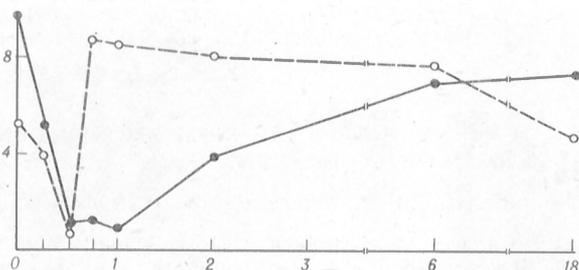


Рис. 5. Динамика экспрессии протоонкогена *c-mas* в мозге п. р.

тивации транскрипции генов дифференцировки, генов, ответственных за морфологию и адгезивные свойства синапсов.

Таким образом, в процессе развития и функционирования нервных сетей в мозге различные группы генов работают взаимосвязанно и взаимозависимо.

Наблюдаемое усиление экспрессии изученных протоонкогенов у контрольных 6—18-месячных животных, так же как и в случае нейрональных генов, по-видимому, связано с функционированием зрелого мозга, обеспечивающего пластические перестройки синаптических взаимосвязей в течение жизни.

После пренатального облучения происходит снижение уровня экспрессии протоонкогенов в раннем постнатальном онтогенезе (у 1—7-дневных крыс) (см. рис. 4, 5). Аналогичная динамика наблюдалась и для нейрональных генов (см. рис. 1, 2).

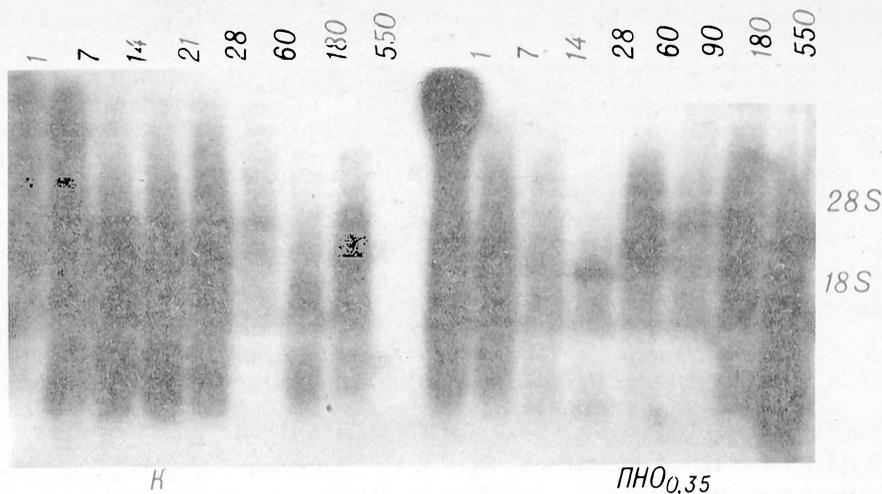
Начиная с 3 нед постнатального развития отмечается повышение содержания транскриптов протоонкогенов. Этот период связан с завершением функционального созревания мозга. С другой стороны, в этот же период наблюдается развитие максимального дефицита массы мозга. Вероятно, так же как и в случае нейрональных генов, повышенный уровень экспрессии протоонкогенов отражает компенсаторную реакцию корковых нейронов в условиях пострадиационной гибели значительной части их популяции. Повышенное содержание мРНК-протоонкогенов сохраняется до 2—6 мес постнатального развития; через 18 мес отмечается подавление уровня транскриптов протоонкогенов. Данный факт, аналогичный наблюдаемому для нейрональных генов, также, по-видимому, свидетельствует о функциональной неполноценности мозга в отдаленный период после облучения.

Наряду с изменением общего уровня транскриптов наблюдаются различия в экспрессии индивидуальных мРНК-протоонкогенов (по крайней мере для гена *c-fos*) (рис. 6). Следует отметить, что максимальное содержание специфического транскрипта гена *c-fos* (2,2 т. п. н.) наблюдается в период, совпадающий с завершением функционального созревания мозга (3—4 нед п. р.). Высокий уровень транскриптов (2,2 т. п. н.) отмечается у взрослых животных (6—8-месячных). Начиная с 3-недельного возраста у облученных животных происходит усиление экспрессии гена *c-fos*, при этом увеличено содержание как высокомолекулярных транскриптов, так и мРНК длиной 1,8 и 2,2 т. п. н. Наиболее высокое содержание зрелого транскрипта гена *c-fos* (2,2 т. п. н.) отмечается у 2-месячных животных, а более низкомолекулярного транскрипта (1,8 т. п. н.) — у 6-месячных. Поскольку уровень высокомолекулярной мРНК *c-fos* в период 3 нед — 6 мес существенно не меняется, можно предположить, что изменение концентрации двух зрелых транскриптов гена *c-fos* происходит в результате изменения скорости процессинга мРНК-предшественника и также может иметь адаптивное значение.

Интересно отметить аналогию пострадиационных изменений динамики различных форм мРНК генов *c-fos* и ПКС (см. рис. 3, 6).

Рис. 6. Гибридизация РНК, выделенной из мозга контрольных (К) и ПНО крыс с ³²P-меченной плазмидой р fos-1, содержащей вставку гена c-fos.

Вверху — дни после рождения; справа и слева отмечено положение 28S и 18S рРНК.



Важно подчеркнуть, что активация экспрессии протоонкогенов происходит за счет увеличения количества высокомолекулярных транскриптов. Это напоминает распределение транскриптов в нормальном мозге новорожденных животных и, вероятно, также связано с изменением скорости транскрипции и процессинга.

Полученные результаты позволяют предположить, что протоонкогены, как и специфические мозговые ткани, участвуют в процессах компенсации пострадиационной потери клеток мозга. Остается невыясненной роль активации экспрессии протоонкогенов в канцерогенезе, однако повышенный уровень протоонкогенов, реценторов, ростовых факторов, сохраняющийся на протяжении длительного времени, может создавать благоприятный фон для развития опухолевого процесса.

Заслуживает внимания факт появления в коре мозга 18-месячных крыс в норме большого количества низкомолекулярных транскриптов, которые, возможно, гомологичны так называемым ID-последовательностям. Эти высокоповторяющиеся последовательности обнаружены в нитронах структурных генов мозга и могут выступать в качестве активаторов транскрипции структурных генов.

В этот же период времени у облученных животных наряду с понижением уровня транскриптов исследованных нами генов наблюдается подавление экспрессии низкомолекулярных транскриптов.

Итак, в настоящей работе впервые описана динамика экспрессии тканеспецифических генов и протоонкогенов в головном мозге ПНО крыс. Первоначальный период активации экспрессии генов, по-видимому, представляет собой компенсаторную реакцию на радиационную гибель клеток развивающегося мозга. В дальнейшем наступает фаза подавления активности всех изученных генов, что коррелирует с развитием функциональной неполноценности мозга в отдаленные сроки после пренатального облучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боровицкая А. Э., Евтушенко В. И., Хансон К. П. // Докл. АН СССР.— 1990.— Т. 315, № 6.— С. 1482—1484.
2. Зайцев Г. П. Математическая статистика в экспериментальной ботанике.— М., 1984.
3. Шенерд Г. Нейробиология: Пер. с англ.— М., 1987.

4. Ярмоненко С. П. Радиобиология человека и животных.— 3-е изд.— М., 1988.
5. Antal S., Fonagy A., Fulop Z. et al. // Int. J. Radiat. Biol.— 1984.— Vol. 46.— P. 425—433.
6. Bos T. J., Bohmann D., Tsuchie H. et al. // Cell.— 1988.— Vol. 52.— P. 705—712.
7. Chirgwin J. M., Przybyla A. E., Mac Donald R. J., Rutter W. J. // Biochemistry (Wash.).— 1979.— Vol. 18.— P. 5294—5299.
8. Doll R. // Brit. J. Radiol.— 1981.— Vol. 54.— P. 179—186.
9. Forman D., Cook-Mozaffar P., Darby S. et al. // Nature.— 1987.— Vol. 329.— P. 499—505.
10. Gourt-Brown W. M., Doll R., Hill A. B. // Brit. med. J.— 1960.— Vol. 2.— P. 1539—1545.
11. Goridis C., Santony J., He H. T. et al. // J. Cell Biol.— 1986.— Vol. 103.— P. 145.
12. Job T. T., Leibold G. J., Fitzmaurice H. A. // Amer. J. Anat.— 1935.— Vol. 56.— P. 97.
13. Kaack B., Walker L., Brizzee K. R., Walker M. // J. Neurochem.— 1980.— Vol. 34.— P. 1772—1775.
14. Karns L. R., Shi Chung Ng., Freeman J. A., Fishman M. S. // Science.— 1987.— Vol. 236.— P. 597—600.
15. Khandjian E. W. // J. molec. Biol.— 1986.— Vol. 11.— P. 107—115.
16. Mac Mahon B. // New Engl. J. Med.— 1985.— Vol. 312.— P. 576—577.
17. Makowske M., Birnbaum M. J., Ballester R., Rosen O. M. // J. biol. Chem.— 1986.— Vol. 261.— P. 13389—13392.
18. Mole R. H. // Int. J. Radiat. Biol.— 1990.— Vol. 57.— P. 647—663.
19. Nojima H. // J. molec. Biol.— 1989.— Vol. 208.— P. 269—282.
20. Piontkovskii I. A. // Bull. exp. Biol. Med.— 1961.— Vol. 51.— P. 27—31.
21. Sassone-Corsi P., Dez C. J., Verma J. M. // Molec. Cell Biol.— 1989.— Vol. 9.— P. 3174—3183.
22. Shiono P., Chung C. S., Myriantopoulos N. S. // J. nat. Cancer Inst.— 1980.— Vol. 65.— P. 681—686.
23. Shull W. D., Otake M. // Rad. Risks to the Devel. Nervous System.— Stuttgart, 1986.— P. 399—419.
24. Stewart A. M., Webb J. W., Giles B. D. // Lancet.— 1956.— Vol. 2.— P. 447.
25. Thomas P. S. // Meth. Enzymol.— 1983.— Vol. 100.— P. 255—266.
26. Weber L. W. D., Schmahl W. G., Kriegel H. // Devel. Effects of Prenatal Irrad.— Stuttgart, 1982.— P. 233.
27. Young D., O'Neill K., Jessell T., Wigler M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1988.— Vol. 85.— P. 5339—5342.

Поступила 29.04.91

EFFECT OF PRENATAL NEUTRON IRRADIATION ON GENE EXPRESSION IN DEVELOPING RAT BRAIN

A. E. Borovitskaya, V. I. Evtushenko, K. P. Hanson

Central Institute of Roentgenology and Radiology, Ministry of Public Health of the USSR, Institute of Oncology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

0.5 Gy prenatal neutron irradiation at the 17 day of gestation resulted in activation of gene expression in brain. Elevated

level of neuronal (GAP-43, NCAM, protein kinase C, calmodulin) and protooncogene (c-fos, c-jun, c-myc) gene transcripts in brain of 2-4 weeks old rats well correlated both with brain maturation in normal animals and development of brain weight deficiency in the irradiated rats. Activation of gene expression appears to be a compensatory response of surviving brain cells to irradiation. Suppression of the gene activity in brain of 18 months old rats correlated with impairment of brain functions at later periods after prenatal irradiation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.155.392.2]-07:616.155.32-008.931:577.152.34]-074

В. С. Былинкина, Н. В. Голубева, Т. А. Гуреева, Л. А. Локшина, А. М. Полянская, Р. С. Самойлова

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНАЗ В ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

НИИ гематологии и интенсивной терапии Всесоюзного гематологического научного центра (ВГНЦ) Минздрава СССР, Москва

Изучение протеолитических ферментов в лимфоидных клетках важно как для понимания молекулярных механизмов патогенеза лимфоидных заболеваний (ЛПЗ), так и для поисков биохимических маркеров, которые могли бы быть использованы в диагностике и прогнозировании течения заболеваний. Полученные в последние годы данные указывают на важность такого рода исследований. Установлено, что один из основных иммунологических маркеров, используемых при диагностике острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) — CALLA (CD10), является нейтральной эндонептидазой (КФ 3.4.24.11) [14, 19]; антиген миелоидных клеток CD13, который присутствует также и на лимфоидных бластных клетках больных ОЛЛ, был идентифицирован как аминопептидаза N [15]. Эти ферменты, а также динептидиламинопептидаза IV (ДАП-IV) (CD26), экспрессирующаяся преимущественно на активированных Т-клетках [8, 12], как полагают, могут участвовать в образовании и инактивации факторов дифференцировки и пролиферации лимфоидных клеток [13, 18]. В процессы дифференцировки и активации лимфоидных клеток, по-видимому, могут быть включены и другие ферменты.

Данных о наборе и активности протеиназ в отдельных иммунологически охарактеризованных субпопуляциях лимфоидных клеток крайне мало [8, 18]. В связи с этим нами предпринято сравнительное изучение спектра протеолитических ферментов и их ингибиторов в опухолевых лимфоидных клетках периферической крови, полученных от больных с разными формами ЛПЗ [4]. Настоящая работа является частью этих исследований и посвящена изучению ДАП-IV, активатора плазминогена (АП) урокиназного типа и катепсинов В и L в этих клетках. Интерес к последним ферментам объясняется тем, что многие опухоли и трансформированные клетки синтезируют увеличенное количество АП [5, 21] и катепсинов В и L, секретируя в среду аномальные формы этих протеиназ; с их экспрессией на мембране связывают метастатический потенциал ряда опухолей [17, 20]. Полагают, что с повышенной продукцией АП могут быть связаны

нарушения в системе гемостаза, что часто сопровождается ЛПЗ. Выяснение корреляции между активностью названных ферментов в опухолевых лимфоидных клетках и формой ЛПЗ может оказаться полезным в дифференциальной диагностике, а также прогнозировании течения этих заболеваний.

Методика. В работе использованы клетки периферической крови больных с различными формами ЛПЗ. Диагноз устанавливали на основании комплексной оценки клинических, гематологических и иммунохимических данных. Фенотипическую принадлежность лимфоидных клеток определяли методом иммунофлюоресценции на основании экспрессии линейно-специфических и дифференцировочных антигенов, идентифицируемых моноклональными антителами: ОКТ 10 (CD 38), ОК1а, ОКТЗ (CD 3) (фирма «Ortho», США); НРСА-1 (CD 34), Leu7 (CD 57), Leu12 (CD 19), Leu16 (CD 20), Leu14 (CD 22), анти-СR₁ (CD 35), анги-СR₂ (CD 21) (фирма «Becton-Dickinson», Германия); CALLA (CD 10), Дако-Т11 (CD 2), Дако-Т6 (CD 1), Дако-Т2 (CD 7), Дако-Т4 (CD 4), Дако-Т8 (CD 8), Дако-Т1 (CD 5), Дако-JL2-R (CD 25), Дако-RSC-1 (CD 30), Дако-p150, 95 (CD 11c) (фирма «Dakopatts», Дания); Ver13 (CD 16) («Behring», Германия); Ико-24 (CD 38) (ВОИЦ, СССР); ВСА-Р38 (CD 38), ВСА-16 (CD 5) (ВГНЦ, СССР). Определяли также степень экспрессии мембранных иммуноглобулинов (m-Ig) и число клеток, несущих рецепторы для эритроцитов мыши. Уровень дифференцировки лимфоидных В- и Т-клеток оценивали на основании экспрессии дифференцировочных и стадийноспецифических антигенов [10, 16].

Обследовано 40 пациентов, лимфоидные клетки которых были представлены относительно однородной популяцией; содержание патологических клеток в периферической крови больных составляло 60—95%. Иммунологический фенотип лимфоидных клеток у 14 больных был подробно охарактеризован. Больных ОЛЛ было 9: 3 с Т-клеточным вариантом (Т-ОЛЛ), 3 с В-клеточным вариантом (В-ОЛЛ), 3 с ни Т-, ни В-ОЛЛ; с Т-вариантом хронического лимфолейкоза (Т-ХЛЛ) было 4, с синдромом Сезари — 3; с В-вариантами ХЛЛ — 6, с пролимфоцитарным, лимфобластным вариантами неходжкинской лимфомы (НХЛ) — 13, с волосатоклеточным лейкозом (ВКЛ) — 6.

Лимфоидные клетки выделяли из концентрата, полученного после сеансов лимфоцитафереза, или из периферической крови путем градиентного центрифугирования в верографин — фиколле [7]. Примесь эритроцитов удаляли путем гемализации в растворе 0,83% NH₄Cl. Клетки трижды отмывали 0,15 М раствором NaCl в фосфатном буфере pH 7,2. В конечных суспензиях число лимфоидных клеток составляло более 90%. Морфологический состав клеток при ХЛЛ был представлен малыми лимфоцитами, при ВКЛ — лимфоидными клетками с бахромчатым краем цитоплазмы («волосатые» клетки), при НХЛ наряду с малыми лимфоцитами значительную долю составляли пролимфоциты и лимфобласты (в зависимости от морфологического варианта лимфосаркома).

Лизаты получали путем разрушения лимфоидных клеток, суспендированных в 0,15 М NaCl pH 7,2 (20—40 · 10⁶ клеток/мл), на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2 (трижды по 30 с при частоте 22 Гц, 4 °С). После озвучивания нерастворимый материал отделяли центрифугированием при 6000 g, а центрифугат использовали для определения активности ферментов.

Активности ДАП-IV, АП урокиназного типа и суммарную активность катепсинов В и L (В+L) измеряли по гидролизу специфических флюорогенных субстратов¹ 7-амино-4-метилкумаринаминов глицил-L-пролина (Gly-Pro-MCA), карбобензоксиглицил-L-арагинина (Z-Gly-Gly-Arg-MCA), карбобензоксиглицил-L-фенилаланил-L-аргинина (Z-Phe-Arg-MCA) соответственно. При определении активности ДАП-IV и АП пробы объемом 500 мкл содержали 4 · 10⁻³ М субстрата, 0,1 М фосфатный буфер pH 7,8 и 50—100 мкл лизата. При определении активности катепсинов В+L пробы содержали 3 · 10⁻³ М субстрата, ЭДТА и дитиотреитол (1—5 · 10⁻⁴ М), 0,1 М фосфатный буфер pH 6,5 и 10—50 мкл лизата. Гидролиз субстратов проводили при 37 °С в течение 10—30 мин. После остановки реакции (pH 4,0) измеряли флюоресценцию образовавшегося 7-амино-4-метилкумарина при 335 нм (возбуждение) и 410 нм (излучение) на флюориметре «Opton». Из-за различного содержания белка в исследуемых опухолевых клетках

¹ Субстраты были синтезированы в Институте биологической и медицинской химии АМН СССР В. Ф. Поздневым, которому мы приносим благодарность.

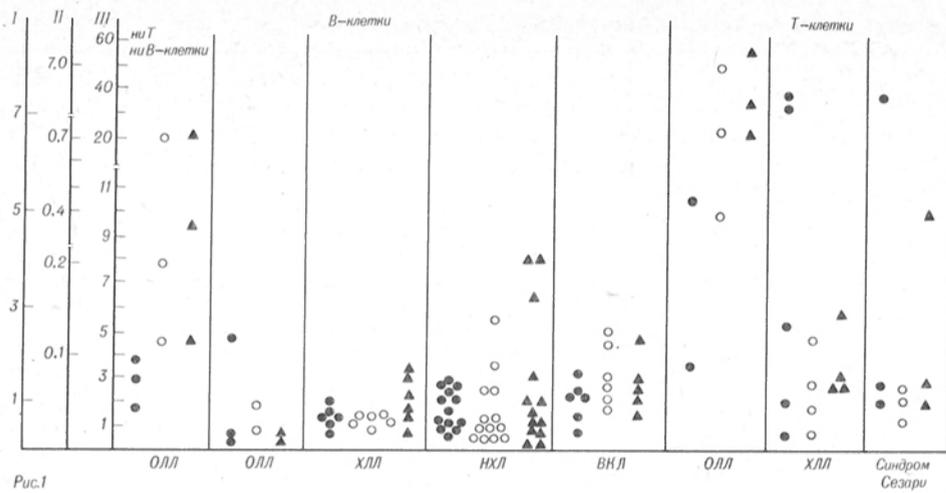


Рис.1

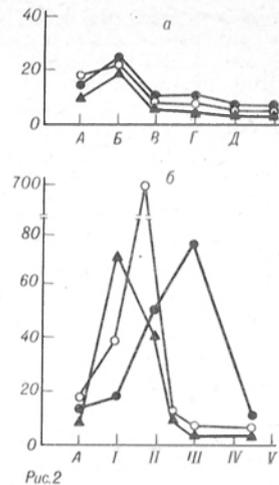


Рис.2

Рис. 1. Активность ДАП-IV (темные кружки), АП (светлые кружки) и катепсинов В+L (треугольники) в опухолевых лимфоидных клетках при разных формах ЛПЗ. По оси ординат — удельная активность ДАП-IV (I), АП (II) и катепсинов В+L (III) в нмоль/мин/10⁶ клеток.

Рис. 2. Активность ДАП-IV, АП и катепсинов В+L в опухолевых лимфоидных клетках В-ряда (а) и Т-ряда (б) на разных стадиях дифференцировки.

По осям абсцисс — активность ДАП-IV, АП и катепсинов В+L, отн. ед. 1 отн. ед. для ДАП-IV, АП и катепсинов В+L соответственно (а): А — предшественники лимфоидных клеток, Б — предшественники В-клеток, В — ранние, Г — промежуточные, Д — зрелые, Е — поздние; б) А — предшественники лимфоидных клеток, I—V — стадии дифференцировки. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

активность ферментов выражали двумя способами: в наномолях продукта, освобожденного за 1 мин на 1 мг белка, и в наномолях в 1 мин на 10⁶ клеток. В настоящей работе представлены данные об активности ферментов в расчете на клетку. Контрольные исследования на нормальных субпопуляциях лимфоцитов периферической крови не приведены ввиду резкого различия нормальных и опухолевых клеток по содержанию белка [3] и связанной с этим невозможностью адекватного представления активности ферментов в пересчете на клетку.

Результаты и обсуждение. Для биохимической характеристики отдельных субпопуляций лимфоидных клеток больных с В- и Т-клеточными вариантами ЛПЗ было проведено определение активности ДАП-IV, АП и катепсинов В+L. Величины активности этих ферментов и их соотношение в отдельных типах клеток в большей или меньшей степени различались. Лимфоидные клетки больных с В-клеточными вариантами заболеваний (исключая острые лейкозы) характеризовались сравнительно низкой активностью всех исследуемых протеиназ (рис. 1), при этом при отдельных формах заболеваний (ХЛЛ, НХЛ и ВКЛ) выявить существенные различия ни для одного из изученных ферментов не удалось. Наиболее низкая и близкая по величине активность каждого из ферментов обнаружена в группе больных ХЛЛ. Иная картина наблюдалась при анализе данных в случаях ОЛЛ. Эта группа включала в себя больных как с В-, так и с ни Т-, ни В-иммунологическими вариантами, поскольку последние, возможно, представляют собой В-клетки ранних этапов дифференцировки [1]. В этих клетках выявлены большие различия в активности АП и катепсинов В+L (от самых высоких значений до величин, характерных для хронических форм; см. рис. 1). Возможно, что разброс в активности ферментов объясняется разной степенью зрелости исследуемых клеток.

При анализе данных, полученных при исследовании клеток больных с Т-клеточными вариантами ЛПЗ, были обнаружены резкие колебания активности ферментов (см. рис. 1). Особенно четко это

выявлялось для АП и катепсинов В+L. Активность АП при Т-ОЛЛ более чем в 100 раз, а катепсинов В+L почти в 20 раз превышала активность этих ферментов при Т-ХЛЛ и синдроме Сезари. В последнем случае у 1 из 3 больных наблюдались высокая активность катепсинов В+L. В отличие от этих ферментов наивысшая активность ДАП-IV была выявлена при редком варианте Т-ХЛЛ и у одного больного синдромом Сезари. В первом случае клетки экспрессировали на поверхности одновременно антигены Т-хелперов и Т-супрессоров (Т₄ и Т₈), что соответствует ранней тимической стадии дифференцировки. Во втором случае клетки имели необычный фенотип: Т₃⁻, Т₂⁺, Т₄ и, возможно, представляли собой активированные клетки. Ранее нами было сделано предположение, что повышенная экспрессия ДАП-IV может быть связана не с принадлежностью клеток к определенной иммунологической субпопуляции Т-лимфоцитов [12, 18], а со стадией дифференцировки [2].

Учитывая полученные данные и принимая во внимание, что при различных формах и вариантах ЛПЗ лимфоидные клетки могут находиться на разных стадиях дифференцировки [1, 9], представляло интерес рассмотреть исследуемые клетки как своего рода модельную систему для выявления биохимических маркеров и соответствия их иммунохимическим, характеризующим стадии дифференцировки. Для этого нами были отобраны клетки 14 больных с различными формами ЛПЗ, которые были охарактеризованы по уровню их дифференцировки в соответствии с их иммунологическим фенотипом. В таблице представлены данные об относительной активности исследуемых протеиназ в этих клетках. Анализ полученных результатов позволил выделить две группы клеток: одну от больных ОЛЛ (№ 1—5), характеризующуюся высокой активностью исследуемых ферментов; другую от больных ХЛЛ, НХЛ, ВКЛ и с синдромом Сезари (№ 7, 8, 10—14), имеющую низкую актив-

Активность протеиназ в лейкозных лимфоидных клетках на разных стадиях дифференцировки

№ клет-ток	Диагноз	Фенотип лимфоидных клеток	Стадия дифференцировки	Относительная активность		
				ДАП-IV	АП	катепсины В+L
1	ОЛЛ	НРСА-1 ⁺ , Ia ⁺ , T1 ⁻ , T6 ⁻ , T3 ⁻ , CALLA ⁻	Предшественники лимфоидных клеток	++	++	++
2	ОЛЛ	НРСА-1 ⁻ , Ia ⁺ , T10 ⁺ , T2 ⁻ , T1 ⁻ , T6 ⁻ , T4 ⁻ , T8 ⁻ , CALLA ⁻	то же	++	(++++)	+++
3	ОЛЛ	НРСА-1 ⁺ , Ia ⁺ , T10 ⁺ , CALLA ⁺ , T1 ⁻	В-клеток	++	+++	+++
4	ОЛЛ	НРСА-1 ⁺ , T10 ⁺ , T6 ⁻ , T4 ⁻ , T8 ⁻ , CALLA ⁻ , Ia ⁻	Т-клетки: (стадия): I	++	++++	++++
5	ОЛЛ	НРСА-1 ⁻ , T10 ⁺ , T6 ⁺ , T4 ⁺ , T8 ⁺ , CALLA [±] , Ia [±]	II (?)	+++	(++++)	++++
6	ХЛЛ	T10 ⁻ , T11 ⁺ , T6 ⁻ , T4 ⁺ , T8 ⁺ , T3 ⁺ , CALLA ⁻ , Ia ⁻	III	++++	+	+
7	ХЛЛ	T10 ⁻ , T2 ⁻ , T11 ⁺ , T1 ⁻ , T6 ⁻ , T4 ⁻ , T8 ⁺ , T3 ⁺ , Ia ⁻	IV—V	+	+	+
8	Синдром Сезари	T2 ⁺ , T11 [±] , T1 ⁺ , T4 ⁺ , T8 ⁻ , T3 ⁺ , Ia [±]	зрелые Tc IV—V зрелые Tх	+	(+)	+
9	ОЛЛ	НРСА-1 ⁺ , Ia ⁺ , CALLA ⁺ , B1 [±] , T1 ⁻ , T3 ⁻	В-клетки: пре-В	(+)	(+)	(+)
10	ХЛЛ	Ia ⁺ , B4 ⁺ , B1 ⁺ , EM ⁺ , Ig ⁻ , T1 ⁺	ранние	+	+	+
11	НХЛ	Ia ⁺ , B1 ⁺ , EM ⁺ , Ig ⁺ , T1 ⁻	промежуточные	+	+	+
12	НХЛ	Ia ⁺ , CALLA ⁻ , B1 ⁺ , EM ⁻ , B2 ⁺ , Ig ⁺ , T1 ⁻	зрелые	+	(+)	+
13	НХЛ	Ia ⁺ , B4 ⁺ , CALLA ⁻ , B1 ⁺ , EM ⁻ , B2 ⁻ , Ig ⁺⁺⁺ , T1 ⁻	поздние	+	(+)	+
14	ВКЛ	Ia ⁺ , CALLA ⁺ , B1 ⁺ , EM ⁻ , Ig ⁺ , B3 ⁺ , p-150,95 ⁺ , II 2R ⁻ , RSC-1 ⁺	зрелые	+	+	+

Примечание. Относительная активность (от + до +++) дана на основании следующих величин активности: для ДАП-IV +0,4—1,3, ++ 1,31—3,0, +++ — 3,1—6,0, ++++ 6,1—7,5; для АП соответственно 0,02—0,09, 0,1—0,19, 0,2—0,29, 0,3—0,45; для В+L соответственно 1,3—4,0, 4,1—10,0, 10,1—20,0, 21,1—60,0. (++++) активность выше величин, обозначенных +++, (+) активность ниже величин, обозначенных +.

ность протеиназ. Клетки первой группы по уровню дифференцировки соответствовали общим предшественникам лимфоидных клеток, предшественникам В-клеток и Т-клеткам, находящимся на ранней тимической стадии созревания. К клеткам второй группы относились зрелые Т- и В-клетки, находящиеся на стадиях от пре-В до зрелых клеток. Вместе с тем клетки (№ 3 и 9), полученные от больных ОЛЛ, резко отличались по уровню активности исследуемых ферментов, а также по содержанию белка. Фенотип клеток № 9 указывал на более зрелую стадию их дифференцировки (пре-В-клетки) в отличие от клеток № 3 (предшественники В-клеток). Обнаруженный разброс в активности АП и катепсинов В+L при острых формах В-клеточных вариантов ЛЛЗ (см. рис. 1) может быть связан также с различным уровнем дифференцировки исследуемых клеток.

Следует отметить, что, характеризуя АП и катепсины В+L в различных лимфоидных клетках, мы выявляли лишь активность ферментов, не связанных с соответствующими ингибиторами. Полученные данные поэтому не отражают их истинного содержания ферментов в клетках. Возможно, недостаточностью ингибиторов и вследствие этого нарушением регуляции активности указанных ферментов можно объяснить чрезвычайно высокую их активность в клетках (№ 2, 4 и 5) больных ОЛЛ (см. таблицу). На присутствие эндогенных ингибиторов в лимфоцитах указывают результаты наших предыдущих исследований [4], а также данные отдельных авторов [6, 11]. Факт обнаружения очень высокой активности протеиназ в ряде слу-

чаев ОЛЛ требует дальнейшего изучения и оценки его клинического значения в прогнозировании течения заболеваний.

Сопоставление активности исследуемых протеиназ в опухолевых В- и Т-клетках со стадиями дифференцировки представлено на рис. 2. При дифференцировке клеток-предшественников изменения активности всех исследуемых протеиназ находились в определенной зависимости от принадлежности клеток к Т- или В-субпопуляциям. При дифференцировке клеток в направлении В-ряда активность протеиназ снижалась на уровне пре-В-лимфоцита и оставалась практически без изменений в ходе дальнейшего созревания. При дифференцировке Т-клеток на начальных стадиях, протекающих в тимусе, имело место резкое увеличение активности каждого из исследованных ферментов с последующим ее снижением, причем каждая стадия характеризовалась максимальной активностью одной из исследованных протеиназ.

Полученные результаты представляют собой первые сведения о ряде протеиназ опухолевых лимфоидных клеток человека с охарактеризованным фенотипом. Эти данные получены на ограниченном материале и носят предварительный характер. Тем не менее они указывают на существование корреляции между уровнем активности исследуемых протеиназ и степенью дифференцировки опухолевых лимфоидных клеток. Дальнейшие комплексные иммунохимические и биохимические исследования патологических лимфоидных клеток человека, с нашей точки зрения, являются перспективными и могут быть использованы для оценки прогно-

ЛИТЕРАТУРА

1. Барышников А. Ю., Кадагидзе З. Г., Махонина Л. А. и др. // Иммунологический фенотип лейкозной клетки. — М., 1989.
2. Былинкина В. С., Голубева Н. В., Гуреева Т. А. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1989. — № 7. — С. 85—88.
3. Геворкян П. М., Локшина Л. А., Николаева Н. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 5. — С. 72—76.
4. Гуреева Т. А., Голубева Н. В., Былинкина В. С. и др. // Проблемы клинической энзимологии. — Ужгород, 1989. — С. 34—35.
5. Лягинский А. В., Егоров Б. Б. // Вопр. онкол. — 1989. — № 12. — С. 1418—1425.
6. Alavaiko M., Aine R., Riine A. et al. // Int. J. Cancer. — 1985. — Vol. 35. — P. 319—325.
7. Voym A. // Scand. J. clin. Lab. Invest. — 1968. — Suppl. 97. — P. 31—50.
8. Flad H.-D., Gruber M., Scholz W. et al. // Advanc. Biosci. — 1987. — Vol. 65. — P. 19—25.
9. Foon K. A., Todd R. F. // Blood. — 1986. — Vol. 68. — P. 1—31.
10. Fridman A. S., Nadler L. M. // Semin. Hemat. — 1987. — Vol. 24, N 4. — P. 230—239.
11. Gerard R., Meidell R. // Ann. Rev. Physiol. — 1989. — Vol. 51. — P. 245—262.
12. Knapp W., Rieber P., Dörken B. et al. // Immunol. Today. — 1989. — Vol. 10, N 8. — P. 253—258.
13. LeBien T. W., McCormack R. T. // Blood. — 1989. — Vol. 73, N 3. — P. 625—635.
14. LeTarte M., Vera S., Tran R. et al. // J. exp. Med. — 1988. — Vol. 168, N 4. — P. 1247—1253.
15. Look A. T., Ashmun R. A., Shapiro L. H. et al. // J. clin. Invest. — 1989. — Vol. 83, N 4. — P. 1299—1307.
16. Minowada J., Minato K., Srivastava B. // International Symposium on Current Concepts in Human Immunology and Cancer Immunomodulation. — Amsterdam, 1982. — P. 75—84.
17. Rozhin J., Wade R. L., Honn K. V. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1989. — Vol. 164, N 1. — P. 556—561.
18. Schön E., Demuth H.-U., Eichman E. et al. // Scand. J. Immunol. — 1989. — Vol. 29. — P. 127—132.
19. Shipp M., Vijayaraghavan J., Smidt E. V. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1989. — Vol. 86, N 1. — P. 297—301.
20. Sloane B. F., Rozhin J., Hatfield T. S. et al. // Exp. Cell Biol. — 1987. — Vol. 55. — P. 209—224.
21. Venuat A.-M., Soria C., Soria J. et al. // Cancer (Philad.). — 1988. — Vol. 62. — P. 1952—1957.

Поступила 07.03.91

ACTIVITY OF PROTEINASES IN LYMPHOID CELLS OF PATIENTS WITH VARIOUS LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS

V. S. Bylinkina, N. V. Golubeva, T. A. Gureeva, L. A. Lokshina, A. M. Polyanskaya, R. S. Samoylova

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Hematology and Intensive Therapy, All-Union Hematological Centre, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow.

Activities of dipeptidyl-aminopeptidase IV, urokinase-like plasminogen activator, cathepsins B and L were studied in lymphoid cells of patients with various forms of lymphoproliferative disorders. Activity of the enzymes studied was found in all the T- and B-cell, although rate and ratio of the enzymatic activity were dissimilar in various cell types. The highest rate of activity exhibited cells at early stages of maturation obtained from patients with acute lymphoblastic leukemia, while low level of the proteinase activity was detected in cells of patients with chronic lymphoid leukemia, non-Hodgkin lymphoma, hairy cell leukemia and Sezary disease, corresponding to mature T- and B-subpopulations. As shown by analysis of the cells immunological phenotype and their proteolytic activity, the rate of lymphoid cells differentiation correlated with level of proteinases activity. Series of proteinases were firstly studied in human malignant lymphoid cells with known phenotype. The enzyme assay may be used in diagnosis and treatment of patients with lymphoproliferative disorders.

Л. Б. Горбачева, К. В. Гудцова, Л. Ю. Дедерер, И. С. Соколова, Л. А. Сибельдина, П. Ю. Шкарин

ИЗМЕНЕНИЯ В АППАРАТЕ РЕПЛИКАЦИИ И СОСТОЯНИИ ПУЛА ФОСФОРСОДЕРЖАЩИХ МЕТАБОЛИТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЖИВОТНЫХ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ

Институт химической физики АН СССР, Москва

Химиотерапевтическая активность лекарственных препаратов существенно изменяется в зависимости от доли пролиферирующих клеток в популяции опухолевых клеток. Уменьшение доли ДНК-синтезирующих и накопление неделяющихся клеток в растущей опухоли могут быть одной из причин изменения ее чувствительности к цитостатикам.

Изучение некоторых биохимических особенностей опухолевых клеток в процессе развития опухоли может способствовать пониманию причин этого явления. Развитие опухолевого процесса сопровождается нарушениями в регуляции синтеза макромолекул из их низкомолекулярных предшественников. Существенную роль в изменении биохимического статуса клеток могут играть изменения структуры хроматина и активности ферментов комплекса реплитазы, куда относят ДНК-полимеразы α и β , а также ферменты, участвующие в синтезе дезоксирибонуклеотидов *de novo* и по запасному пути. Тимидинкиназа (ТК) катализирует превращение тимидина в тимидинмонофосфат (ТМФ) и является основным ферментом запасного пути синтеза ДНК. Рибонуклеотидредуктаза (РР) — ключевой фермент синтеза *de novo* — катализирует скорость-лимитирующую реакцию восстановления дезокси-нуклеозиддифосфатов (ДНДФ) в нуклеозиддифосфаты (НДФ). ДНК-полимераза α — основной фермент, участвующий в репликации, а ДНК-полимераза β — в репарации повреждений ДНК.

В настоящей работе определяли активность ферментов комплекса реплитазы (ТК, РР, ДНК-полимераз α и β), скорость включения $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина и дезокси- $2\text{-}^{14}\text{C}$ -уридина в ДНК, образование одиночных разрывов в ДНК в процессе развития экспериментальных лейкозов Р388 и L1210. Кроме того, в условиях *in vivo* изучали изменения в пуле фосфорсодержащих метаболитов в клетках меланомы В16 на разных стадиях развития опухоли.

Методика. Клетки лейкоза Р388 ($10^6\text{--}10^7$) и L1210 ($5\text{-}10^6$) прививали внутривенно мышам BDF 1 (С57В1 \times DBA/2). Меланоме В16 прививали подкожно мышам С57В1/6 \times СВА.

$2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидин (5 мкКи) или дезокси- $2\text{-}^{14}\text{C}$ -уридин (2 мкКи) вводили внутривенно мышам-опухоленосителям за 1 ч до забоя. Детальное описание методик изучения синтеза ДНК описано ранее [3, 4]. Одиночные разрывы ДНК определяли методом ультрацентрифугирования лизатов клеток в градиенте плотности нейтральной сахарозы в условиях высокой ионной силы в присутствии различных концентраций этидиумбромида (ЭБ) [10, 18]. Активность ДНК-полимераз α и β и ТК определяли, как описано ранее [8, 16]. Разделение тимидина, ТМФ, тимидиндифосфата и тимидинтрифосфата проводили ступенчатой хроматографией с 0,2, 1,0 и 1,6 М LiCl (2, 4 и 16 мин соответственно)

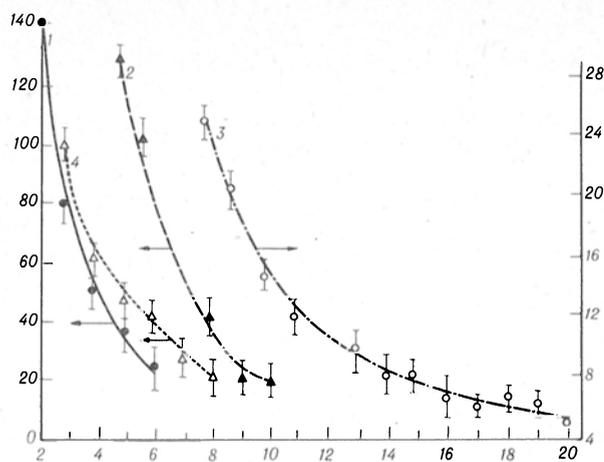


Рис. 1. Включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК клеток лейкозов L1210 (1) и P388 (2), меланомы B16 (3) и дезокси- $2\text{-}^{14}\text{C}$ -уридина в ДНК клеток лейкоза P388 (4) в процессе развития опухолей.

По оси абсцисс — время, сут. по осей ординат: слева — имп/мин на 1 мг ДНК $\cdot 10^4$, справа — имп/мин на 1 мг ДНК $\cdot 10^5$.

на PEI-целлюлозе. Радиоактивность измеряли в сцинтилляционном счетчике «Дельта-300» («Тип Analytic», США). Активность РР определяли биохимическим методом по превращению ^{14}C -цитидиндифосфата в ^{14}C -дезокситимидиндифосфат и методом ЭПР-спектроскопии [2, 21]. Сигнал ЭПР регистрировали на радиоспектрометре «Bruker ER 220D», используя стандартную программу для обработки данных на компьютере «Aspect». Оксимочевину использовали как специфический ингибитор РР [2, 14]. Спектры ЯМР на ядрах ^{31}P получены на спектрометре «P-360 Bruker» при частоте 145 и 78 МГц. Условия эксперимента описаны в работе [4].

Результаты и обсуждение. Как показано на рис. 1, рост опухолей P388, L1210 и меланомы B16 сопровождается замедлением включения $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК, что объясняется увеличением доли неделящихся клеток. Для лейкоза P388 показано, что к 8-м суткам после трансплантации 90 % клеток не делятся, но полностью сохраняют жизнеспособность, что проявляется при последующей прививке здоровым мышам [9].

Опыты с использованием меченого дезоксиуридина продемонстрировали, что уменьшение синтеза ДНК с ростом опухоли происходит не только за счет запасного пути, но и за счет синтеза дезоксирибонуклеотидов *de novo*. Таким образом, уменьшение количества ДНК-синтезирующих клеток коррелирует с замедлением синтеза ДНК как *de novo*, так и по запасному пути. Причем синтез ДНК *de novo* уменьшается менее резко, чем по запасному пути. Возможно, эти различия свидетельствуют об изменении соотношения синтеза дезокситимидинтрифосфата по запасному пути и *de novo* в процессе развития лейкоза P388.

Нарушения вторичной структуры ДНК исследовали методом ультрацентрифугирования лизатов клеток P388 в градиенте плотности нейтральной сахарозы в условиях высокой ионной силы. Конформационные изменения нуклеоида являются интегральным показателем повреждения хроматина, что должно сказываться на его седиментационной подвижности. Достоверных различий в профилях седиментации нуклеоида из этих клеток на разных стадиях развития опухоли выявить не удалось (рис. 2). Для повышения

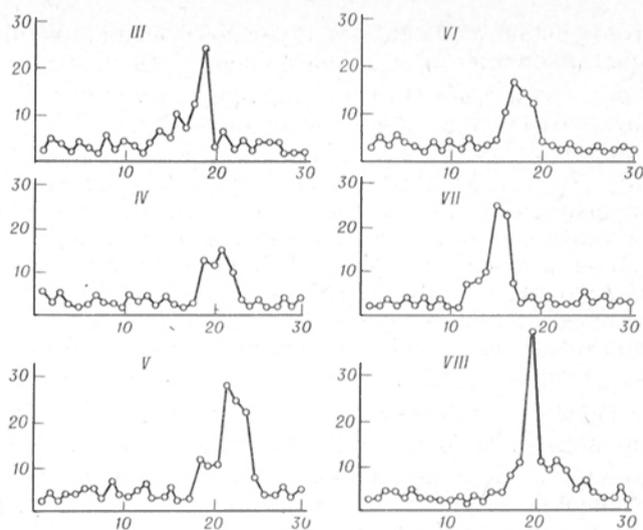


Рис. 2. Седиментация предсуществующей ДНК нуклеоида клеток лейкоза P388 в градиенте плотности нейтральной сахарозы в разные сроки развития лейкоза.

По оси абсцисс — номер фракции; по оси ординат — % от общей радиоактивности. Римские цифры — срок развития лейкоза, сут.

чувствительности метода использовали градиенты плотности сахарозы, содержащие различные концентрации интеркалирующего агента ЭБ. Этот метод позволяет определять несколько разрывов на молекулу ДНК [18]. Нативная ДНК имеет бифазную кривую зависимости седиментационной подвижности от концентрации ЭБ, отражающую конформационные состояния ДНК: при концентрации ЭБ 1 мкг/мл происходит уменьшение отрицательной суперспирализации ДНК, при 2—6 мкг/мл — ее исчезновение, при 10 мкг/мл — образование оппонентной суперспирализованной ДНК. Седиментационная подвижность нуклеоида в различные сроки развития опухоли практически одинакова (рис. 3).

Таким образом, нами впервые с использованием чувствительных методов было показано отсутствие одиночных разрывов ДНК на поздних стадиях развития опухоли, когда большинство клеток не делится. Следует отметить, что большинство работ по определению вторичной структуры ДНК в клетках с различной пролиферативной активностью проводили с культурами клеток *in vitro*. В ДНК покоящихся лимфоци-

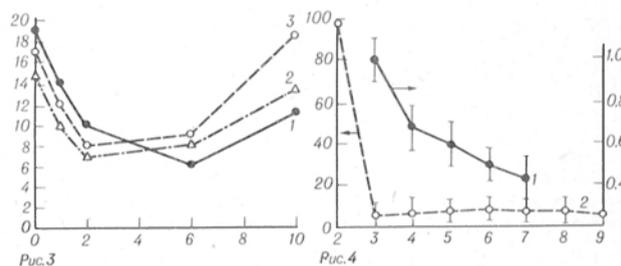


Рис. 3. Зависимость седиментационной подвижности ДНК нуклеоида клеток лейкоза P388 от концентрации ЭБ.

1 — 3-е сутки, 2 — 6-е сутки, 3 — 7-е сутки развития лейкоза P388. По оси абсцисс — концентрации ЭБ, мкг/мл; по оси ординат — номер фракции.

Рис. 4. Зависимость активности РР (1) и ТК (2) от срока развития лейкоза P388.

По оси абсцисс — время, сут.; по осей ординат: слева — пмоль ТФМ в 1 млн на 10^6 клеток, справа — интенсивность дублетного сигнала, отн. ед.

тов человека было обнаружено большое количество разрывов и значительное уменьшение их при стимуляции лимфоцитов фитогемагглютинином, что и послужило основанием считать одиночные разрывы маркерами иеделющихся клеток [5]. С другой стороны, в экспериментах с использованием метода щелочной элюции не было обнаружено заметного количества разрывов ДНК покоящихся лимфоцитов [11]. Результаты противоположного характера, по всей вероятности, объясняются несовершенством применяемых методов, когда локальные расщепления регистрируются как разрывы [12].

Определение активности ферментов ТК и РР проводили в течение роста лейкоза Р388. Активность ТК резко снижается в первые дни после трансплантации и остается на очень низком уровне до гибели животных. Активность РР плавно уменьшается с ростом опухоли (рис. 4). При сравнении рис. 1 и 4 видно, что изменения в синтезе ДНК хорошо коррелируют с уменьшением активности РР. Эти данные подтверждают, что РР играет важную роль в контроле синтеза ДНК и клеточной пролиферации [7].

РР — ключевой фермент синтеза дезоксирибонуклеотидтрифосфата (ДНТФ) *de novo*, катализирующий реакцию восстановления ДНДФ в ПДФ. В состав РР, который регулирует баланс ДНТФ в клетке, входит свободный радикал аминокислотного остатка тирозина. Известно, что повышенная активность РР характерна для активно делящихся клеток. Так, активность РР коррелирует со скоростью роста гепатом; активность РР в медленно и быстро растущих гепатомах различается в 200 раз [7]. Активность ТК в нормальных неделящихся клетках чрезвычайно низка, но в культурах различных опухолевых клеток она возрастает в 5—100 раз [20]. Наблюдаемое нами и другими авторами [22] резкое падение активности ТК в первые дни развития лейкозов Р388 и L1210 трудно поддается объяснению. Предполагается, что увеличение активности ТК при переходе клеток в фазу деления происходит благодаря повышению эффективности трансляции предшествующей мРНК, кодирующей ТК [19]. Поскольку уменьшение активности ТК предшествует ингибированию синтеза ДНК и активность этого фермента чрезвычайно низка и в ДНК-синтезирующих клетках, можно предположить, что ТК участвует в регуляции перехода делящихся клеток в неделящиеся. Однако это предположение требует дополнительных исследований.

Все опубликованные ранее данные, посвященные изучению активности ДНК-полимеров α и β , были получены в экспериментах на культурах нормальных и трансформированных клеток млекопитающих [6, 13, 15]. Проведенное нами исследование активности этих ферментов показало, что в клетках лейкоза Р388 активность ДНК-полимеразы α уменьшается с 3-х по 5-е сутки развития лейкоза Р388, а затем слегка увеличивается. Активность ДНК-полимеразы β существенно возрастает на поздних стадиях развития лейкозов, когда основную часть популяции составляют неделящиеся клетки (рис. 5). Аналогичные данные были получены нами и в опытах на клетках лейкоза L1210 [1].

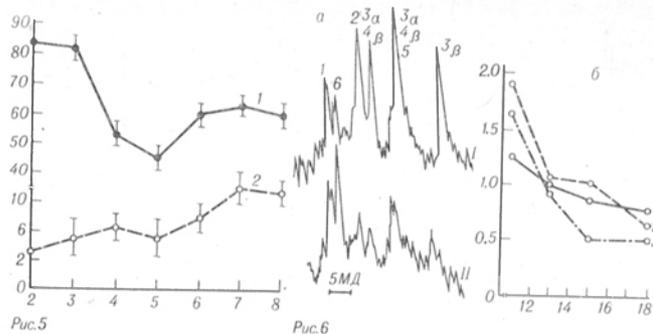


Рис. 5. Изменение активности ДНК-полимераз α (1) и β (2) при развитии лейкоза Р388.

По оси абсцисс — время, сут.; по оси ординат — активность ферментов, нмоль ДНТФ/мин на 10^6 клеток $\cdot 10^5$.

Рис. 6. Спектры ^{31}P -ЯМР опухоли одной и той же мыши, полученные при помощи поверхностной катушки на 11-е (I) и 18-е (II) сутки развития меланомы В16 (а) и (б) — изменение отношений амплитуд (А) сигналов ФС (1), КФ (2) и АТФ (3) к Φ_{H} .

По оси абсцисс — время, сут.; по оси ординат — $\alpha = \Lambda_{\text{ФС}}/\Lambda_{\Phi_{\text{H}}}$; $\Lambda_{\text{КФ}}/\Lambda_{\Phi_{\text{H}}}$; $\Lambda_{\text{АТФ}}/\Lambda_{\Phi_{\text{H}}}$. 1 — ФС, 2 — КФ, 3 — АТФ, 4 — АДФ, 5 — ПЛД, 6 — Φ_{H} .

Нам не удалось наблюдать прямую зависимость между изменениями в синтезе ДНК и активностью ДНК-полимеразы α . Это можно объяснить сложностью взаимовлияний ферментов комплекса репликазы. Вероятно, падение активности ДНК-полимеразы α тоже вносит свой вклад в этот процесс наряду с другими ферментами комплекса репликазы, такими, как ТК и РР. Обнаруженное нами впервые значительное увеличение активности ДНК-полимеразы β на терминальной стадии развития опухоли представляет определенный интерес для характеристики популяции иеделющихся клеток. Однако остается неясным, обусловлено ли повышение уровня ДНК-полимеразы β модификацией этого фермента или активацией его синтеза. Повышается ли активность ДНК-полимеразы β во всех клетках или только в неделящихся, составляющих основную долю популяции? Можно предположить, что отсутствие разрывов ДНК на терминальных стадиях развития опухоли связано с повышенной активностью ДНК-полимеразы β . Недавно было показано, что в клетках лейкоза Р388, резистентных к диаминдихлорплатине (II) и резистентных к N-алкил-N-нитрозомочевине, активность ДНК-полимеразы β в 3 раза превышает таковую в чувствительных клетках [1, 16]. Одной из причин лекарственной устойчивости на поздних стадиях развития опухоли может быть активация ДНК-полимеразы β .

Не исключено, что эффективность действия лекарственных препаратов может быть связана с энергетическим статусом опухолевых клеток. Однако имеются лишь единичные исследования в этом направлении.

Нам представлялось целесообразным провести прижизненную регистрацию состояния пула фосфорсодержащих соединений в клетках солидной опухоли меланомы В16 на разных стадиях развития. В отличие от лейкозов рост солидных опухолей сопровождается значительным уменьшением степени оксигенации опухолей, ослаблением процессов дыхания и аэробного гликолиза.

В начальной стадии развития меланомы В16

спектр ^{31}P -ЯМР характеризуется высокой интенсивностью сигналов от фосфатов сахаров (ФС), АТФ и креатинфосфата (КФ) (рис. 6, а, спектр I). По мере развития опухоли интенсивность сигналов от АТФ, АДФ, НАД, КФ, ФС по сравнению с сигналом неорганического фосфата (P_i) уменьшается (см. рис. 6, а, спектр II). Изменения относительных уровней фосфорсодержащих метаболитов приведены на рис. 6, б.

Наблюдаемое падение уровня макроэргических соединений и одновременное адекватное увеличение уровня P_i были отмечены ранее в опытах с другими экспериментальными опухолями животных [17] и, возможно, свидетельствуют об увеличении доли неделяющих клеток в процессе роста меланомы В16 мышей. Нельзя исключить и возможность частичной гибели клеток на терминальной стадии развития опухоли.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что на терминальных стадиях развития опухоли, обогащенные неделяющимися клетками, приобретают новые биохимические особенности, которые могут изменять их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гудцова К. В., Кукушкина Г. В., Горбачева Л. Б. // Биохимия.— 1991.— № 5.— С. 21—23.
2. Гудцова К. В., Пулатова М. К., Горбачева Л. Б. // Докл. АН СССР.— 1987.— Т. 297.— С. 480—484.
3. Соколова И. С., Островская Л. А., Бунто Т. В., Горбачева Л. Б. // Вопр. онкол.— 1976.— Т. 22.— С. 61—65.
4. Соколова И. С., Шкарин П. Ю., Дубинский В. З. и др. // Докл. АН СССР.— 1989.— Т. 271.— С. 223—227.
5. Boerrigter M. E., Mullaart E., van der Schans T. A., Vijg J. // Exp. Cell Res.— 1989.— Vol. 180.— P. 569—573.
6. Chang L. M. S., Bollum F. J. // J. biol. Chem.— 1973.— Vol. 248.— P. 339—343.
7. Elford H. L. // GANN Monogr. Cancer Res.— 1972.— Vol. 13.— P. 205—217.
8. Gorbacheva L. B., Kukushkina G. V., Durdeva A. D., Ponomarenko N. A. // Neoplasma.— 1988.— Vol. 35.— P. 3—14.
9. Harris J. W., Shon B., Meneses J. // Cancer Res.— 1973.— Vol. 33.— P. 1780—1789.
10. Hartwig M. // Acta biol. med. germ.— 1978.— Bd 37.— S. 421—435.
11. Johnstone A. P., Williams G. T. // Nature.— 1982.— Vol. 300.— P. 368—372.
12. Hartwig M. // Exp. Cell Res.— 1990.— Vol. 189, N 1.— P. 148—150.
13. Kraker A. J., Moore C. W. // Cancer Lett.— 1988.— Vol. 38.— P. 307—314.
14. Lassman G., Liermann B., Lehman W. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1985.— Vol. 132.— P. 1137—1142.
15. Lehman I. R., Kaguni L. S. // J. biol. Chem.— 1989.— Vol. 264.— P. 4265—4269.
16. Maehara Y., Nakamura H., Nakane Y. et al. // GANN.— 1982.— Vol. 73.— P. 289—293.
17. Ng T. C., Evanochko W. T., Hiramoto R. N. et al. // J. Magn. Reson.— 1982.— Vol. 49, N 2.— P. 271—286.
18. Romagna F., Kulkarni M. S., Anderson M. W. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1985.— Vol. 127.— P. 56—62.
19. Sherey J. L., Kelly T. J. // J. biol. Chem.— 1988.— Vol. 263.— P. 8350—8358.
20. Shiotani I., Hashimoto Y., Tanaka I., Irino S. // Cancer Res.— 1989.— Vol. 49.— P. 1090—1096.
21. Steeper J. R., Steuart C. D. // Analyt. Biochem.— 1970.— Vol. 34.— P. 123—129.
22. Szikla K., Pokorny E., Hullan L., Holczinger I. // Cancer Biochem. Biophys.— 1981.— Vol. 5.— P. 259—263.

ALTERATIONS IN THE REPLICATION APPARATUS AND IN PHOSPHORUS-CONTAINING METABOLITES POOL DURING GROWTH OF TUMORS IN ANIMALS

L. B. Gorbacheva, K. V. Goodtsova, L. Yu. Dederer, I. S. Sokolova, L. A. Sibeldina, P. Yu. Shkarin

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Activity of replitase complex enzymes involving thymidine kinase (TK), ribonucleotide reductase (RR), DNA-polymerases α and β as well as DNA synthesis and single breaks in DNA were studied during growth of P388 ascites tumor. Under these conditions the rate of DNA synthesis was distinctly decreased via salvage pathway and *de novo*. Single breaks were not detected in the preexistent DNA within various periods after transplantation of P338 leukemic cells. Retardation of DNA synthesis during tumor growth correlated with a decrease in TK, RR and DNA-polymerase α activities, while DNA-polymerase β activity was markedly increased. Growth of melanoma B16 was accompanied by a decrease in content of ATP, ADP, NAD, phosphocreatine and phosphosaccharides as well as by an increase in the level of inorganic phosphates.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616-006-018.1:576.385.5]-008.931:577.152.34

Э. А. Дилакян, Н. И. Соловьева, Л. З. Тополь

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ОНКОГЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ КРЫСЫ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва, Институт канцерогенеза Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР, Москва

В настоящее время не вызывает сомнений участие протеолитических ферментов в процессах канцерогенеза, в частности в процессах инвазии и метастазирования. Важная роль в этих процессах наряду с коллагеназами принадлежит цистеиновым протеиназам — катепсином В и L [5, 16]. В последние годы установлено, что активные или предшественные формы катепсинов L и В синтезируются клетками некоторых злокачественных опухолей и трансформированными клетками в культуре [10, 13, 14, 16]. Эти ферменты могут секретироваться или быть ассоциированы с поверхностью опухолевой клетки [10, 11, 13—17]. Активность катепсинов коррелирует со степенью злокачественности ряда линий опухолей [5, 16]. Однако функции цистеиновых протеиназ в процессах онкогенной трансформации и метастазирования неясны. Недавно установлено, что онкобелок p21^{ras} ингибирует активность цистеиновых протеиназ [8], что позволяет предполагать включение последних в процесс трансформации уже на начальных стадиях. В связи с этим важное значение приобретает вопрос об изучении цистеиновых протеиназ и их ингибиторов на отдельных этапах канцерогенеза. Удобной моделью для изучения многостадийного процесса трансформации является введение различных онкогенов в клетку.

Целью данной работы было изучение экспрессии цистеиновых протеиназ на разных этапах канцерогенеза. Исследование проводили на ранее разработанной модельной системе эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных в результате трансфекции двух разных генов: генов

ранней области аденовируса обезьяны SA7 и последующей трансфекции онкогеном *c-Ha-gas* [3]. Эта модель позволяет выделить две дискретные стадии злокачественной трансформации *in vitro*: иммортализацию и туморогенную трансформацию.

Методика. В работе использовали следующие линии клеток: REF — первичные эмбриональные фибробласты крысы; REF-1 — иммортализованная клеточная линия, полученная после трансфекции ДНК плазмиды рАЛ13, содержащей геном ранней области аденовируса обезьяны SA7 (в опытах использовали клетки, полученные на 36 пассаже) [4]; REF-2EJ — трансформированные фибробласты крысы, полученные из опухоли бестимусной мыши, индуцированной введением клеток REF-1, трансфицированных онкогеном *c-Ha-gas* [3]. Клетки культивировали в течение 24, 48 и 96 ч в смеси бессывороточной среды ДМЕМ ("Serva", Германия) и гидролизата лактальбумина в соотношении 1:1, с добавлением 0,03 % раствора глутамина, а также пенициллина и стрептомицина (100 ЕД на 1 мл среды). Смену среды производили через 48 ч. Клетки смывали с поверхности стекла 0,0002 % раствором химопсина в 0,02 % растворе версена, а затем 4–5 раз промывали раствором Хенкса и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. Клетки и культуральную жидкость хранили при –30 °С.

Для получения лизатов клеток в пробы добавляли 0,45 % раствор NaCl, содержащий 1 мМ CaCl₂ и 0,1 % тритона X-100 (из расчета 1·10⁷ клеток в 1 мл раствора) и подвергали 6-кратному замораживанию-оттаиванию. Далее клетки разрушали в тефлоновом гомогенизаторе в течение 10 мин; осадок отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 7000 об/мин при 4 °С. Для дальнейшей работы использовали супернатант.

В опытах использовали интактную культуральную жидкость и культуральную жидкость после диализа при 4 °С в течение 30 ч против 0,45 % раствора NaCl, содержащего 1 мМ CaCl₂.

В работе применяли среду ДМЕМ фирмы "Flow Lab." (Великобритания), раствор витаминов ВМЕ фирмы "Serva" (Германия). В качестве активаторов и ингибиторов использовали дитиотрейтол (ДТТ), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), йодуксусную кислоту фирмы "Serva" (Германия). Остальные реактивы отечественного производства.

Для определения активности цистеиновых ферментов использовали следующие субстраты: 7-амино-4-метил-кумарин-амиды карбобензокси-L-фенилаланил-L-аргинина (Z-Phe-Arg-MCA) и карбобензокси-L-аланил-L-аргинил-L-аргинина (Z-Ala-Arg-Arg-MCA), синтезированные доктором хим. наук В. Ф. Позднеевым в Институте биологической и медицинской химии АМН СССР.

Активность цистеиновых протеиназ оценивали по гидролизу Z-Phe-Arg-MCA (0,03 мМ) и Z-Ala-Arg-Arg-MCA (0,019 мМ) при pH 6,5 в присутствии ДТТ и ЭДТА (1 мМ). Инкубационная смесь содержала исследуемый материал: лизат клеток — 0,02–0,06·10⁶ клеток или 20–100 мкл культуральной жидкости, 30 мкл раствора ДТТ и ЭДТА (1 мМ), 20 мкл раствора субстрата в 70 % диметилсульфоксиде и 0,1 М натрий-фосфатный буфер (до общего объема 0,6 мл). Инкубацию проводили при 37 °С в течение 15 мин (с Z-Phe-Arg-MCA) или 1 ч (с Z-Ala-Arg-Arg-MCA). Реакцию останавливали добавлением 2,4 мл 0,05 М натрий-ацетатного буфера pH 4,0. Освобожденный 7-амино-4-метил-кумарин измеряли при 370 нм (возбуждение) и 460 нм (излучение). Активность выражали в наномолях продукта, освобожденного за 1 мин на 1 мг белка и 1·10⁶ клеток или на 1 мл культуральной жидкости. Содержание белка определяли по [9].

Результаты и обсуждение. Результаты исследования активности цистеиновых протеиназ в лизатах эмбриональных фибробластов крысы, находящихся на разных стадиях онкогенной трансформации, представлены на рис. 1. Прослежена динамика изменения внутриклеточной и секретироваемой активности ферментов в течение 96 ч культивирования клеток. Установлено, что в иммортализованных клетках REF-1 активность внутриклеточных цистеиновых протеиназ существенно (в 3 раза) увеличивалась в течение 24 ч по сравнению с первичными фибробластами (см. рис. 1, а, б).

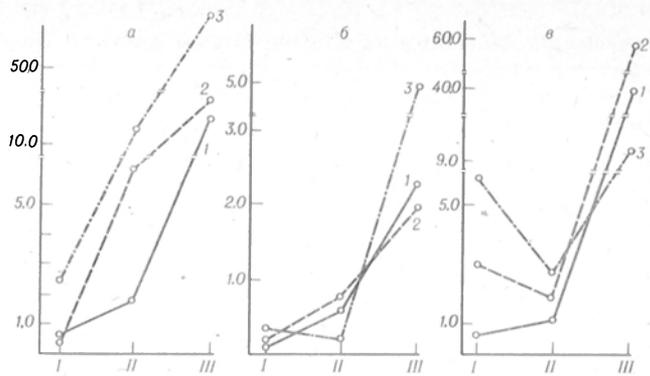


Рис. 1. Активность внутриклеточных (а, б) и секретируемых (в) цистеиновых протеиназ, тестируемых по гидролизу Z-Phe-Arg-MCA (а, в) и Z-Ala-Arg-Arg-MCA (б) в культурах эмбриональных фибробластов крысы.

По оси ординат — активность протеиназ, нмоль/мин/10⁶ клеток. I — REF, II — REF-1, III — REF-2EJ. 1 — 24 ч, 2 — 48 ч, 3 — 96 ч культивирования.

В трансформированных онкогеном *c-Ha-gas* клетках REF-2EJ происходило дальнейшее значительное повышение активности цистеиновых протеиназ. Активность этих протеиназ в клетках REF-2EJ возросла в 6 раз по сравнению с REF-1 и в 20 раз по сравнению с первичными фибробластами.

Исследование динамики изменения внутриклеточной активности протеиназ в клетках, культивированных в течение 48 и 96 ч, показало, что происходит последовательное увеличение активности цистеиновых протеиназ в соответствии с развитием процесса трансформации. Активность протеиназ в иммортализованных клетках REF-1 выше, чем в REF, а наиболее высокая активность отмечена в трансформированных трансфекцией *c-Ha-gas* фибробластах REF-2EJ (см. рис. 1, а, б).

При изучении секретироваемой активности цистеиновых протеиназ (см. рис. 1, в) в зависимости от стадии трансформации и времени культивирования было показано, что в течение первых 24 ч активность секретироваемых протеиназ в линиях клеток REF и REF-1 существенно не отличалась от активности внутриклеточных ферментов, что свидетельствует о равновесном содержании этих ферментов в клетке и вне ее. Однако последующая трансфекция онкогеном *c-Ha-gas* приводила к резкому увеличению секреции цистеиновых протеиназ.

Исследование динамики секреции цистеиновых протеиназ в культурах клеток, культивированных 48 и 96 ч, показало, что на стадии иммортализации активность секретироваемых протеиназ существенно снижена по сравнению с первичными фибробластами. На стадии туморогенной трансформации фибробластов секретироваемая активность цистеиновых протеиназ резко возросла. Следует подчеркнуть, что секретироваемая активность клеток REF-2EJ, культивированных 24 и 48 ч, в 30 раз выше, чем активность иммортализованных клеток REF-1, и приблизительно в 55 и 18 раз соответственно выше секретироваемой активности эмбриональных фибробластов. Таким образом, увеличение продукции внутриклеточных и секретироваемых цистеиновых протеиназ в исследованных клеточных линиях коррелирует с развитием процесса онкогенной трансформации.

Для идентификации отдельных цистеиновых

Активность в лизатах клеток и культуральной жидкости, определяемая по гидролизу Z-Phe-Arg-MCA и Z-Ala-Arg-Arg-MCA

Культура клеток	Длительность культивирования, ч	Активность в лизатах клеток				Активность в культуральной жидкости			
		Z-Phe-Arg-MCA		Z-Ala-Arg-Arg-MCA		Z-Phe-Arg-MCA		Z-Ala-Arg-Arg-MCA	
		нмоль/мин/10 ⁶	% активности	нмоль/мин/10 ⁶	% активности	нмоль/мин/10 ⁶	% активности	нмоль/мин/10 ⁶	% активности
REF	24	0,634	100	0,058	9	0,781	100	0,006	0,7
	48	0,449	100	0,117	26	3,213	100	0	0
	96	3,590	100	0,365	10	6,148	100	0,01	0,1
REF-1	24	1,980	100	0,570	30	1,350	100	0,013	0,9
	48	6,390	100	0,618	10	2,120	100	0,014	0,6
	96	0,276	100	0,100	36	3,810	100	0,006	0,2
REF-2EJ	24	11,910	100	2,350	19	42,400	100	0,525	1,2
	48	13,700	100	2,180	15	59,000	100	1,280	2
	96	54,790	100	5,140	9	9,720	100	0	0

протеиназу внутриклеточную и секретируемую активность в исследуемых культурах клеток оценивали по расщеплению двух синтетических субстратов: Z-Phe-Arg-MCA, гидролизуемого как катепсином L, так и катепсином B, и Z-Ala-Arg-Arg-MCA — специфического субстрата катепсина B. Как видно из табл. 1, определяемая во всех клеточных линиях активность по гидролизу Z-Phe-Arg-MCA обусловлена действием протеиназы, подобной катепсину L. Активность катепсина B составляла лишь 10—30 % от внутриклеточной активности цистеиновых протеиназ, а в культуральной жидкости активность этого катепсина практически не определялась (см. табл. 1). Анализ влияния ингибиторов разных классов протеолитических ферментов на исследуемую активность подтвердил, что гидролиз Z-Phe-Arg-MCA во всех исследованных культурах клеток осуществляется именно цистеиновой протеиназой (табл. 2).

Исследование активности катепсина L-подобной протеиназы в культуральной жидкости показало, что в результате диализа активность протеиназы увеличивалась (рис. 2). При этом активность цистеиновой катепсина L-подобной протеиназы в культуральной жидкости первичных фибробластов и иммортализованных клеток повышалась в 16—20 раз, а в культуральной жидкости трансформированных клеток активность — в 2—4 раза по сравнению с активностью интактной культуральной

жидкости. Это увеличение активности скорее всего связано с диссоциацией фермент-ингибиторного комплекса. Препарация диализованной культуральной жидкости при pH 4,2 в течение 15 мин при 37 °C приводила к дальнейшему увеличению активности катепсина L-подобной протеиназы еще в 1,5—3 раза (см. рис. 2). Эти данные позволяют заключить, что во всех исследованных культурах клеток цистеиновая катепсина L-подобная протеиназа секретируется в предшествующей форме и (или) значительная часть фермента находится в комплексе с ингибитором.

В настоящее время установлено, что главный секретируемый белок — МЕР фибробластов мышцей, трансформированных вирусом саркомы мышцы Кирстен, является предшествующей формой катепсина L [6, 12]. Синтез этого профермента трансформированными фибробластами в 25 раз выше, чем его синтез родительскими клетками, причем 94 % этого белка секретируются из клетки [7]. В исследованных нами культурах фибробластов внутриклеточная активность на 70—90 % обусловлена действием катепсина L-подобной протеиназы, а секретируемая активность связана с действием только этой протеиназы. При этом, как отмечалось выше, активность катепсина L-подобной протеиназы в 25—50 раз превышала активность в первичных фибробластах.

Полученные результаты позволяют охарактери-

Таблица 2

Влияние ингибиторов протеолитических ферментов на их активность, определяемую по гидролизу Z-Phe-Arg-MCA в культурах клеток

Культура клеток	Длительность культивирования, ч	Без добавок		ДТТ-ЭДТА		Йодуксусная кислота		ФМСФ	
		нмоль/мин/10 ⁶	% активности						
REF	24	0	0	4,4	100	0,28	6,4	3,2	72
	48	0	0	1,25	100	0	0	0,75	60
	96	0,15	1,1	13,3	100	0,15	1,1	11,3	85
REF-1	24	0	0	10,33	100	0	0	9,73	94
	48	0	0	12,90	100	0,27	2	11,1	85
	96	0	0	0,818	100	0	0	0,818	100
REF-2EJ	24	0,75	2,9	25,20	100	0	0	25,20	100
	48	0,66	2,5	26,0	100	0	0	25,0	96
	96	2,16	2,4	88,7	100	0,83	0,9	88,7	100

Примечание. Во всех опытах активность, определенную в присутствии ДТТ и ЭДТА, принимали за 100 %. Препарацию с ингибиторами (10⁻⁴ М) проводили в течение 15 мин при 37 °C.

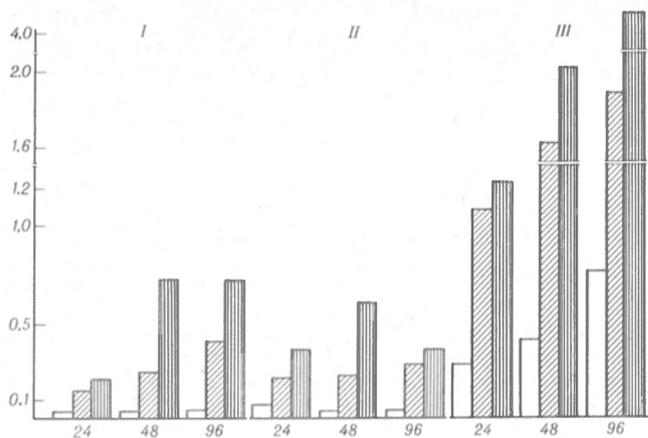


Рис. 2. Активность катепсин L-подобной протеиназы в культуральной жидкости фибробластов крысы.

По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — активность, μмоль/мин/мл. Светлые столбики — активность в культуральной жидкости до диализа; столбики с косой штриховкой — активность в культуральной жидкости после диализа; столбики с вертикальной штриховкой — активность в диализованной культуральной жидкости после преникубации при pH 4.2 ч в течение 15 мин при 37°C. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

зывать каждую стадию трансформации фибробластов исследованной модельной системы и свидетельствуют о корреляции между увеличением активности цистеиновых протеиназ — катепсинов L и B — и развитием процесса трансформации фибробластов (см. рис. 1). Выявлены четкие различия в уровнях и характере изменения активности протеиназ для отдельных клеточных линий. Важно подчеркнуть, что обнаружено существенное отличие иммортализованных клеток REF-1 от первичных фибробластов по уровню как внутриклеточной, так и секретируемой активности цистеиновых протеиназ. Это тем более интересно, что при сравнении экспрессии протоонкогенов *c-fos*, *c-jun* и *c-myc* в эмбриональных фибробластах при их иммортализованном состоянии существенных различий не обнаружено [1, 2]. Стадия полной трансформации фибробластов характеризуется наиболее высокой как внутриклеточной, так и секретируемой активностью цистеиновых протеиназ, что согласуется с имеющимися в литературе данными [5, 11, 14–17]. Проведенные исследования являются первым этапом изучения роли протеолитических ферментов разных типов на отдельных стадиях онкогенной трансформации с использованием указанной модельной системы фибробластов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пospelova T. B., Захарова Ю. В., Медведев А. В. и др. // Цитология. — 1987. — Т. 29, № 9. — С. 1101–1104.
2. Пospelova T. B., Кислякова Т. В., Медведев А. В. и др. // Там же. — 1990. — Т. 32, № 2. — С. 148–155.
3. Тополь Л. З., Спитковский Д. Д., Киселев Ф. Л. // Бюл. экпер. мед. — 1988. — № 3. — С. 329–332.
4. Тополь Л. З., Тараховский А. М., Ревязова Е. С. и др. // Там же. — 1986. — № 2. — С. 190–192.
5. Denhardt D. T., Greenberg A. H., Egom S. E. et al. // Oncogene. — 1987. — Vol. 2. — P. 55–59.
6. Denhardt D. T., Hamilton R. T., Parkell C. L. J. et al. // Cancer Res. — 1986. — Vol. 46. — N 9. — P. 4590–4594.
7. Dong J., Prence E. M., Sahagian G. G. // J. Biol. Chem. — 1989. — Vol. 264, N 13. — P. 7377–7383.
8. Hiwasa T., Yokoyama S., Ha J.-M. et al. // FEBS Lett. — 1987. — Vol. 211, N 1. — P. 23–26.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.

10. Maciewicz R. A., Wardale R. J., Eltherington D. J. // Biochem. Soc. Trans. — 1988. — Vol. 16. — P. 1056–1057.
11. Maciewicz R. A., Wardale R. J., Eltherington D. J. et al. // Int. J. Cancer. — 1989. — Vol. 43. — P. 478–486.
12. Mason R. W., Gal S., Gottesman M. M. // Biochem. J. — 1987. — Vol. 248, N 2. — P. 449–454.
13. Mori J. S., Recklies A. D. // Ibid. — 1986. — Vol. 233. — P. 57–63.
14. Mori J. S., Recklies A. D., Poole A. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 614. — P. 134–143.
15. Rozhin J., Wade R. L., Honn K. V. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1989. — Vol. 164, N 1. — P. 556–561.
16. Sloane B. F., Honn K. V. // Cancer Metastas. Rev. — 1984. — Vol. 3. — P. 249–263.
17. Sloane B. F., Rozhin J., Halkield J. et al. // Exp. Cell Biol. — 1987. — Vol. 55. — P. 209–224.

Поступила 07.03.91

CYSTEINE-DEPENDENT PROTEINASES AT VARIOUS STEPS OF RAT FIBROBLAST MALIGNANT TRANSFORMATION

E. A. Dilakyan, N. I. Solov'yova, L. Z. Topol

Institute of Biological and Medical Chemistry, Institute of Carcinogenesis, All-Union Oncology Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Cysteine-dependent proteinases were studied in a model system of rat embryonal fibroblasts which enabled to evaluate two discrete steps of malignant transformation *in vitro*: immortalization and tumoral transformation. Dynamics of intracellular and secreted activities of cysteine proteinases was estimated in relation to the stage of transformation and duration of cells cultivation. Activation of cysteine proteinases cathepsins L and B correlated with developed transformation of fibroblasts; each step of the process was characterized. Intracellular and secreted activities of the proteinases were distinctly increased in immortalized cells as compared with primary fibroblasts. The highest activity of the enzymes was detected both in intra- and extracellular fractions at the stage of complete fibroblast transformation. Cysteine-dependent cathepsin L-like proteinase was mainly responsible for intracellular and secreted activities of the fibroblast cultures studied. This proteinase was found to be produced in the form of precursor in all the cell strains studied and/or main part of the enzyme developed complexes with an inhibitor.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 576.385.5:575.113

М. М. Забойкин, Р. П. Алехина, А. В. Лихтенштейн

АНАЛИЗ ЯВЛЕНИЯ КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИИ ГЕНОМА В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

НИИ канцерогенеза Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР, Москва

При анализе интактных клеточных ядер (или свежеприготовленных клеточных лизатов) методом дифференциальной диссоциации нуклеопротеидов [4, 5, 8, 11, 12] было неожиданно обнаружено, что хроматографическое распределение ДНК гетерогенно [2]. Это наблюдение не согласуется с общепринятым представлением о целостности и непрерывности ДНК в хромосомах. Казалось интересным выяснить его природу (размер фрагментов, участие нуклеаз и других деградирующих ДНК агентов, степень универсальности и т. д.) независимо от того, является ли оно прижизненным динамическим разбиением генома на отдельные компартменты (см., например, [28]) или же следствием каких-то искусственных воздействий. Соответствующие данные представлены

в настоящей работе. Предварительное сообщение было опубликовано ранее [3].

Методика. В работе использовали фибробласты джунгарского хомячка (ФДХ), трансформированные ОВ40 (линия 4/21), и клетки различных тканей крысы. Клетки лизировали в гомогенизаторе Даунса со слабо притертым пестиком при 4 °С в 250 мМ сахарозе, 60 мМ КСl, 15 мМ NaCl, 3 мМ MgCl₂, 15 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,5 мМ 2-меркаптоэтанол, 2 % Triton X-100, 1 мМ фенолметилсульфонилфториде (ФМСФ). В некоторых опытах в лизирующий раствор вводили спермидин (0,15 мМ) или ингибитор нуклеаз 0,1 % диэтилпиокарбонат (ДЭПК), заменяя в этом последнем случае трис-НСl-буфер на 0,01 М натрий-фосфатный буфер.

Изолированные ядра или нефракционированные клеточные лизаты фиксировали на адсорбенте целите [2, 12]. Лизирующий раствор, прошедший через колонку (примерно 5 мл), и буфер ТМ (25 мМ трис-НСl рН 7,6, 5 мМ MgCl₂), которым дополнительно промывали колонку (примерно 15 мл), объединяли для последующего анализа (фракция «отмыва» или ДНК-О₁). Вслед за этим проводили при 2 °С последовательно градиенты NaCl (ДНК-О₂, ДНК-О₃ и ДНК-О₄) и LiCl-мочевины (ДНК-1₁ и ДНК-1₂). Наиболее прочно ассоциированные с внутриядерными структурами ДНК элюировали градиентом температуры (ДНК-11₁ и ДНК-11₂), как описано ранее [2–5, 8, 12].

ДНК фракции концентрировали сорбцией на оксиапатите и использовали для последующего анализа: переноса на мембранные фильтры и dot-гибридизации с мечеными в реакции ник-трансляции зондами [7] или тотальной ДНК (непрямое мечение) или для электрофореза в агарозе и гибридации по Southern в нашей модификации [6]. В последнем случае преципитаты ДНК — оксиапатит растворяли в 0,5 М ЭДТА, обрабатывали РНКазой А (200 мкг/мл, 1 ч, 37 °С) и протеиназой К (200 мкг/мл, 37 °С в течение ночи), разбавляли в 3,5 раза дистиллированной водой, прибавляли гликоген (10 мкг/мл) и 1 мМ ФМСФ, после чего осаждали ДНК равным объемом изопропанола в присутствии 2 М ацетата аммония, споласкивали 70 % этанолом и после растворения в буфере ТЕ (10 мМ трис-НСl рН 8,0, 1 мМ ЭДТА) и осветления низкоскоростным центрифугированием использовали для последующего анализа.

Концевое мечение ДНК *in situ* (в изолированных ядрах) проводили следующим образом [18]. Ядра (грубый осадок) получали лизисом ФДХ в 2 % Triton X-100, после чего их промывали несколько раз в буфере ТМ, суспендировали в буфере для концевого мечения (50 мМ NaCl, 10 мМ трис-НСl рН 7,5, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотрейтол) из расчета 10⁶ ядер в 100 мкл среды, вносили в среду фрагмент Кленова (2 ед.), ³²Р-dCTP (20 мкКи) и остальные дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (20 мкМ), после чего инкубировали при комнатной температуре 20 мин. Реакцию останавливали охлаждением в ледяной бане и сорбцией ядер на целите. После всех обычных процедур фракционирования и концентрирования ДНК пере-

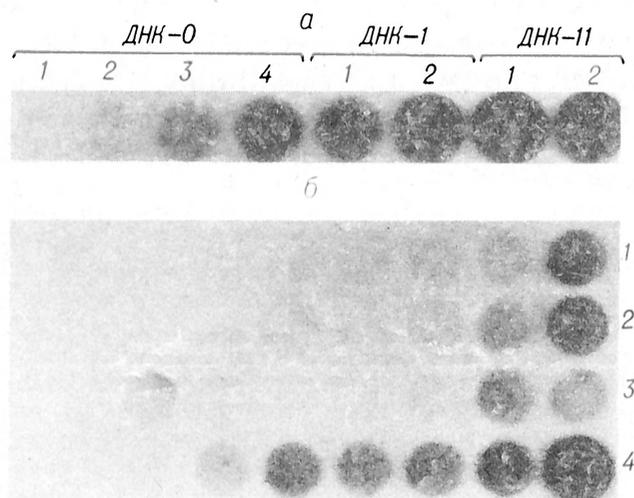


Рис. 1. Распределение ДНК по степени адгезии к внутриядерным структурам.

Клетки, лизированные неионным детергентом, были подвергнуты хроматографическому разделению. ДНК переносил на фильтры и гибридовали с тотальной ³²Р-ДНК соответствующего происхождения. а — клетки ФДХ 4/21; б — ткани самцов беспородных крыс: печень (1), тимус (2), почки (3), мозг (4). Здесь и на рис. 2 — цифры — фракции ДНК.

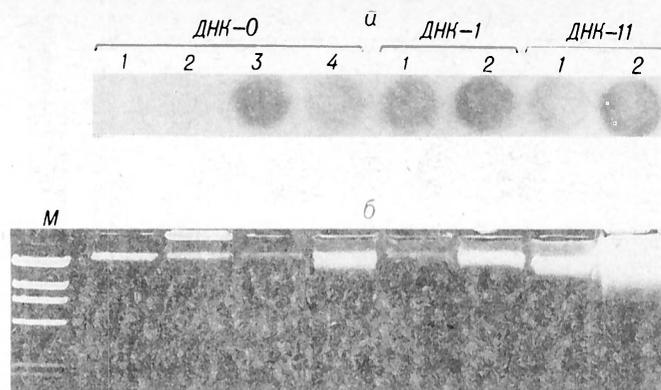


Рис. 2. Анализ ДНК клеток ФДХ.

а — непрямым мечением ДНК гибридизацией в пятнах с тотальной ³²Р-ДНК; б — электрофоретическое разделение ДНК различных фракций ДНК. М — маркеры (HindIII-фрагменты ДНК фага λ : 23,7, 9,5, 6,7, 4,3, 2,3, 2,0 т. п. н.). Окраска бромистым этидием.

носили на нейлоновые фильтры и автордиографировали или разделяли электрофорезом в 1 % агарозе и затем автордиографировали (–70 °С, в присутствии интенсифицирующих экранов).

Результаты и обсуждение. *Распределение интактной ДНК по степени внутриядерной адгезии.* На рис. 1 представлены результаты дифференциальной экстракции ДНК из клеточных лизатов разного происхождения (клетки ФДХ, различные ткани крыс). Клетки лизировали строго по холоду, в присутствии ингибиторов протеаз и нуклеаз (ФМСФ, ДЭПК). Обнаруженное во всех случаях гетерогенное распределение ДНК не согласуется с представлением о целостности и непрерывности ДНК в составе хромосом и может быть в принципе следствием различных искусственных воздействий. Цель ряда последующих экспериментов — проверка этого предположения.

На рис. 2 представлены результаты непрямого мечения ДНК клеток ФДХ гибридизацией в пятнах с тотальной ³²Р-ДНК и гель-электрофореза отдельных фракций ДНК в 1 % агарозе. Видно, что ДНК всех фракций высокомолекулярна — более 20 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.). Здесь необходимо подчеркнуть, что эта оценка размеров ДНК минимальна, поскольку на постхроматографических этапах подготовки ДНК к анализу (таких, например, как сорбция ДНК на оксиапатите с диспергированием преципитатов в гомогенизаторе Даунса, а также многократное пипетирование при переосаждениях) она неизбежно фрагментируется. Можно полагать, что в момент элюции из ядер молекулы ДНК имеют несравненно большие размеры.

Сопоставление данных, представленных на рис. 1 и 2, даст основание для двух важных, на наш взгляд, выводов. Во-первых, видимое отсутствие низкомолекулярных фрагментов (нуклеосомной «лесенки») свидетельствует о том, что независимо от природы этого явления (естественной или искусственной) оно отражает какой-то необычный тип распада ДНК. Во-вторых, оказывается, что в клеточном ядре сосуществуют фрагменты большого размера, сопоставимые с доменом хроматина или, возможно, превышающие его, которые существенно отличаются друг от друга прочностью своей ассоциации (адгезии) с внутриядерными структурами.

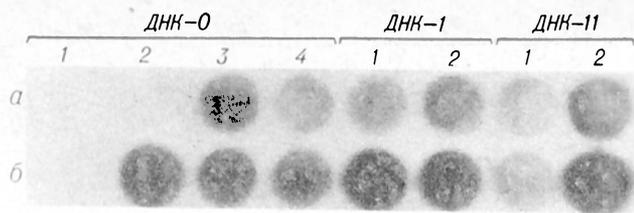


Рис. 3. Влияние скорости эволюции на хроматографическое распределение ДНК.

а — стандартные условия (60 мл/ч); б — скорость эволюции — 12 мл/ч. Детекция ДНК непрямым мечением.

Оценка гидродинамического сдвига и эндогенных нуклеаз как факторов, ответственных за феномен компартиментализации ДНК. Фрагментация ДНК в описанных выше экспериментах может быть следствием по крайней мере двух причин: гидродинамического сдвига в процессе фракционирования и эндонуклеазного гидролиза. Что касается первой из них, то существует возможность того, что в процессе дегистонизации (на протяжении градиента NaCl) происходит «выплетывание» ДНК и образующееся гало из гигантских петель, чрезвычайно чувствительных к гидродинамическим воздействиям, фрагментируется потоком элюента. Для проверки этого предположения сопоставляли распределение ДНК клеток ФДХ при обычных условиях фракционирования и при скорости элюента, в 5 раз меньшей, чем обычная. Если высказанное предположение верно, то эффект компартиментализации должен стать в последнем случае значительно менее выраженным (сдвиг вправо). Результат оказался, однако, прямо противоположным (рис. 3): гетерогенность не только не исчезла, но и стала более выраженной. Таким образом, гидродинамический сдвиг не является, по-видимому, причиной обнаруженного явления.

Возможной причиной видимой компартиментализации ДНК может быть ее гидролиз эндогенными нуклеазами. Для оценки значимости этого фактора первоначальная процедура фракционирования, включающая строгое соблюдение холода, была усилена включением в лизирующий раствор сильных ингибиторов протеаз и нуклеаз (соответственно ФМСФ и ДЭПК). Как видно из рис. 1—3, гетерогенное распределение ДНК сохранилось, несмотря на предпринятые предосторожности.

В следующем опыте анализировали ядра клеток ФДХ, полученные в стандартных условиях, в условиях, благоприятствующих действию ДНКаз (ин-

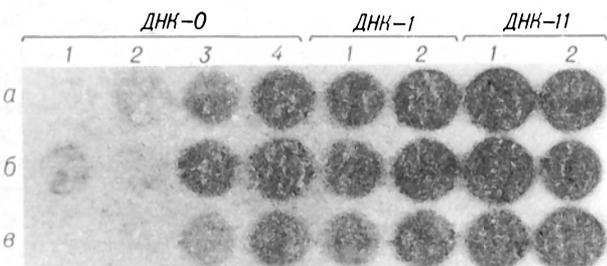


Рис. 4. Влияние условий, препятствующих и способствующих действию эндогенных нуклеаз, на хроматографическое распределение ДНК.

Детекция ДНК непрямым мечением. а — стандартные условия (2°C, 0,1 % ДЭПК, 1 мМ ФМСФ, лизирующий раствор с 3 мМ MgCl₂); б — лизис клеток в стандартных условиях + инкубация 1 ч при 37°C; в — удаление в процессе лизиса клеток двухвалентных катионов (вместо MgCl₂ введено 5 мМ ЭДТА).

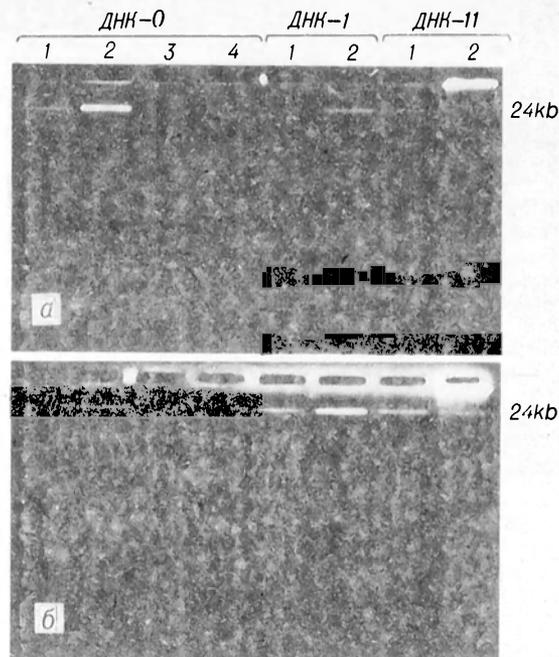


Рис. 5. Электрофоретическое разделение фракции ДНК, полученных из клеток ФДХ.

Клетки лизировали в присутствии 0,1 % ДЭПК (а), или 0,15 мМ спермидина (б). Окраска бромистым этидием.

кубация ядер 1 ч при 37°C), и в условиях, препятствующих действию большинства ядерных нуклеаз (т. е. в присутствии ЭДТА) [11] (рис. 4). Если роль эндогенных нуклеаз в описанном явлении велика, то различия в распределении ДНК в представленных опытах должны быть значительными. Существенных различий, однако, при анализе изолированных ядер, выделенных в столь разных условиях, не было обнаружено.

Известно, что поливалентные катионы (полиамины спермин и спермидин) прочно, а при низкой ионной силе и необратимо связываются с хроматином, способствуя его конденсации и стабилизации [14]. Представляло интерес выяснить, не устранит ли фрагментацию ДНК введение в лизирующий буфер стабилизирующего катиона (0,15 мМ спермидина). На рис. 5 показаны электрофореграммы фракций ДНК клеток ФДХ, лизированных в присутствии ДЭПК или спермидина. В обоих случаях полностью сохранен феномен компартиментализации, одинаковы и размеры фракций ДНК. Вместе с тем в последнем случае очевидно относительное уменьшение легко экстрагируемой ДНК-О₁ (на негативе эта полоса, хотя и ослабленная, видна) и увеличение содержания фракций, более прочно ассоциированных с клеточным ядром. Поскольку этот эффект не вызывается сильным ингибитором нуклеаз ДЭПК, то мы склонны объяснять его конденсирующим хроматин действием полиаминов. Таким образом, хотя участие эндогенных нуклеаз в видимой фрагментации генома не может быть в настоящее время исключено, нет и данных в пользу обратного.

Концевое мечение ДНК *in situ*. В настоящей работе была предпринята попытка пометить концы ДНК *in situ* (рис. 6). С этой целью ядра, выделенные из клеток ФДХ, инкубировали в соответствующем буфере в присутствии фрагмента Кленова и ³²P-dCTP. Поскольку фрагмент Кленова

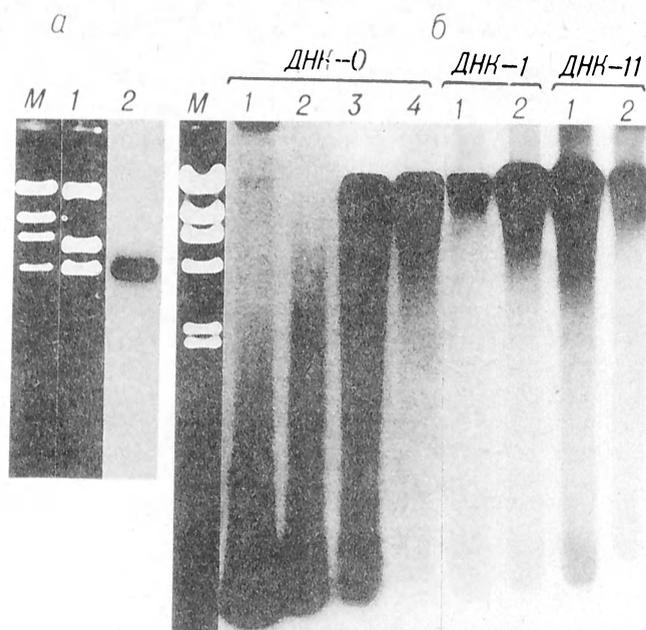


Рис. 6. Концевое мечение ДНК *in situ* и ее анализ в геле-электрофорезе.

a — модельный эксперимент с плазмидой pBR322. Концевому мечению подвергали смесь релаксированной кольцевой, суперспирализованной и линейаризованной рестриктазой HindIII-форм. 1 — окраска бромистым этидием смеси форм, подвергнутых концевому мечению; 2 — автограф меченой ДНК (линейаризованные молекулы); *b* — изолированные ядра ФДХ инкубировали 10 мин в буфере для концевого мечения при 20 °С в присутствии 2 ед. фрагмента Кленова, ³²P-dCTP и «холодных» нуклеозидтрифосфатов, после чего подвергали обычному фракционированию. Фракции ДНК концентрировали, разделяли электрофорезом в 1 % агарозе и автордиографировали. М — маркеры (HindIII-фрагменты ДНК фага λ).

не обладает 5'→3'-экзонуклеазной активностью, то в данных условиях должны метиться концы молекул ДНК (с выступающими 5'-последовательностями) или брешы в виде одонитевых участков. Действительно, в модельном эксперименте, поставленном на плазмиде pBR322 (см. рис. 6), было установлено, что преобладающая доля радиоактивности включается в линейаризованную рестриктазой плазмиду, но не в релаксированную кольцевую форму (3→5-экзонуклеазная активность фермента подавляется в присутствии дезоксинуклеозидтрифосфатов) и не в суперспирализованные молекулы. Незначительное включение метки в релаксированную кольцевую форму обнаруживается лишь при длительной экспозиции автографа.

Цель эксперимента концевого мечения ДНК *in situ* заключалась в выяснении того, существуют ли концевые последовательности в свежеизолированных ядрах или они возникают на последующих этапах фракционирования (в пользу последнего предположения свидетельствовало бы обнаружение хроматографических фракций ДНК, вовсе не содержащих радиоактивную метку). Как видно, однако, из рис. 6, в результате реакции метятся практически все фракции ДНК. Электрофоретическое разделение продуктов реакции показывает, что метятся в основном высокомолекулярные ДНК и лишь в начальных фракциях (ДНК-О) и еще и низкомолекулярные фрагменты. Происхождение последних остается неясным; можно лишь предположить, что в описанной реакции должны, по-видимому, метиться наряду с концевыми последовательностями и одонитевыми брешами и фрагменты Оказаки, часть которых, находящихся вблизи участков *ori*, может в результате экстрезии [9, 30] оказаться в легко

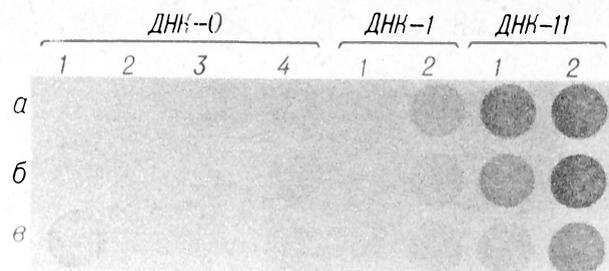


Рис. 7. Влияние ингибиторов топоизомеразы II на хроматографическое распределение ДНК.

Клетки ФДХ 4/21, предварительно меченные ¹⁴C-тимидином (0,1 мКи/мл, 1 с), культивировали в обычных условиях (*a*), 1 ч в присутствии новобиоцина (*b*) или VM26 (*a*). Фракции ДНК переносили на фильтры и автордиографировали.

вымываемых фракциях. (Синтез ДНК сам по себе осуществляется в составе прочно ассоциированной с матриксом ДНК-II [3—5]).

Действие ингибиторов топоизомеразы II. Поскольку в предыдущих экспериментах не нашло подтверждения предположение о том, что компарментализация ДНК является артефактом, то была сделана попытка оценить участие в этом явлении топоизомеразы II — единственного известного в настоящее время фермента, способного *in vivo* вызывать обратимые двунитевые разрывы ДНК [26].

Клетки ФДХ 4/21, меченные предварительно ¹⁴C-тимидином (0,1 мКи/мл, 1 с), инкубировали на протяжении 1 ч при 37 °С с ингибиторами топоизомеразы II — новобиоцином (500 мкг/мл) или VM26 (тенипозид, 100 мкМ), после чего их подвергали обычному анализу. Фракции ДНК переносили на фильтры и автордиографировали (рис. 7). Не отмечено существенного изменения степени гетерогенности ДНК в результате применения указанных ингибиторов. Это наблюдение может свидетельствовать либо о неучастии топоизомеразы II в описанном явлении, либо о том, что образованные с ее участием двунитевые разрывы ДНК не всегда тут же «зашиваются», но могут в определенных ситуациях существовать длительное время.

В литературе существуют отдельные разрозненные описания явления фрагментации ДНК в эукариотических клетках. В отличие от динамической одонитевой фрагментации ДНК, которой приписывают функциональное значение [10, 16, 20, 27], появление двунитевых разрывов обычно связывают с необратимыми проявлениями клеточной гибели, программируемой [15] или индуцированной токсическими агентами [22, 29]. Гидролиз ДНК в этом случае осуществляется, по-видимому, Ca²⁺/Mg²⁺-активируемой эндонуклеазой [15, 21].

Динамическая двунитевая фрагментация ДНК возможна как проявление активности топоизомеразы II (см., например, [28]), участвующей в процессах репликации и транскрипции, а также, по-видимому, в структурной организации доменов хроматина [17, 27]. Именно с активностью топоизомеразы II связывают высвобождение из спленоцитов мыши небольшой (2—4 %) и активно метящейся ³H-тимидином фракции ДНК, солюбилизированной неионным детергентом [31].

Неслучайная фрагментация хромосомной ДНК человека с появлением особой, выявляемой пульс-электрофорезом фракции («форум»-ДНК), описа-

на ранее [13]. Одно из предположений относительно природы этой фракции — существование разрывов в хромосомах *in vivo*.

Обнаружение в клеточном ядре отдельных популяций ДНК, физически не связанных друг с другом, может быть обусловлено также присутствием различных экстрахромосомных элементов, в частности полидисперсных кольцевых ДНК, которые, по-видимому, возникают в результате их «выщепливания» и замыкания фланкирующих повторов посредством незаконной рекомбинации [24]. Этот процесс затрагивает не только повторяющиеся последовательности и сателлитные ДНК, но и структурные гены. Было показано, например, что по мере пассирования фибробластов человека происходит реорганизация генома — выщепление некоторых структурных генов (актина, глобина) и их существование в виде экстрахромосомных элементов [19]. Выщепленные из хромосом последовательности обнаруживаются иногда не только в ядрах, но и в цитоплазме [23]. Неизвестный ранее тип экстрахромосомных структур (0,25—0,5 % тотальной ДНК), имеющих вид гомогенной популяции молекул размером около 650 т. п. н. и содержащих амплифицированные гены, выявлен недавно при помощи пульс-электрофореза [25].

В настоящей работе обнаружено явление видимого разбиения клеточной ДНК на фрагменты большого размера (определить их точные размеры не представляется пока возможным), причем семейства таких фрагментов различаются между собой прочностью ассоциации с внутриядерными структурами. Принципиально одно и то же распределение ДНК обнаружено при анализе разных типов клеток, как культивируемых, так и происходящих из животных тканей. Хотя природа этого явления остается невыясненной, оно имеет ряд свойств, отличающих его от описанных выше. Во-первых, речь в данном случае идет не о минорных фракциях, существующих наряду с хромосомной ДНК, рассматриваемой как единое целое, а о разбиении тотальной ДНК на несколько семейств фрагментов. Представленные данные свидетельствуют против (хотя и не исключают полностью) фрагментации ДНК под воздействием эндогенных нуклеаз и топоизомеразы II. Во-вторых, большие размеры фрагментов и отсутствие сколько-нибудь выраженной нуклеосомной «лесенки» позволяют исключить распад ДНК как следствие программируемой клеточной гибели.

Независимо от того, существует ли явление компартиментализации ДНК *in vivo* или оно возникает искусственно *in vitro*, неожиданным является то обстоятельство, что протяженные отрезки ДНК, сопоставимые по размерам с доменом хроматина (или даже превышающие его), столь резко различаются по степени адгезии к внутриядерным структурам. Наряду с фрагментами, связанными с ядерным скелетом (ДНК-I и ДНК-II), обнаруживаются также молекулы, не ассоциированные с ним (ДНК-О). Наиболее странной, с этой точки зрения, представляется фракция ДНК-О₁, также высокомолекулярная, но вымываемая из клеточных ядер начальными растворами с физиологической ионной силой, т. е. по всей видимости, весьма рыхло связанная с клеточным ядром. Данные, свидетельствующие о неслучайном харак-

тере описанной фрагментации, будут представлены в следующих сообщениях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баснакьян А. Г., Бубнов П. В., Вотрин И. И. // Биохимия.— 1989.— Т. 54.— С. 273—283.
2. Забойкин М. М., Алехина Р. П., Лихтенштейн А. В. // Молекул. биол.— 1989.— Т. 23.— С. 851—861.
3. Забойкин М. М., Алехина Р. П., Лихтенштейн А. В. // Докл. АН СССР.— 1990.— Т. 312.— С. 1000—1002.
4. Забойкин М. М., Алехина Р. П., Лихтенштейн А. В., Шапот В. С. // Там же.— 1985.— Т. 284.— С. 506—509.
5. Забойкин М. М., Моисеев В. Л., Шапот В. С., Лихтенштейн А. В. // Молекул. биол.— 1988.— Т. 22.— С. 1119—1127.
6. Лихтенштейн А. В., Моисеев В. Л., Забойкин М. М. // Там же.— 1987.— Т. 21.— С. 1513—1519.
7. Лихтенштейн А. В., Моисеев В. Л., Забойкин М. М. // J. biochem. biophys. Meth.— 1989.— Vol. 18.— P. 77—84.
8. Лихтенштейн А. В., Сьякте Н. И., Забойкин М. М., Шапот В. С. // Nucl. Acids Res.— 1982.— Vol. 10.— P. 1127—1145.
9. Разин С. В., Кекелидзе М. Г., Луканидин Е. М. // Молекул. биол.— 1986.— Т. 20.— С. 387—395.
10. Сьякте Н. И. // Онтогенез.— 1987.— Т. 18.— С. 229—238.
11. Сьякте Н. И., Забойкин М. М., Лихтенштейн А. В., Шапот В. С. // Молекул. биол.— 1981.— Т. 15.— С. 1321—1329.
12. Сьякте Н. И., Забойкин М. М., Эренпрейса Е. А. и др. // Там же.— 1985.— Т. 19.— С. 1231—1241.
13. Чуриков Н. А., Пономаренко Н. А., Айрих Л. Г. // Докл. АН СССР.— 1988.— Т. 303.— С. 491—493.
14. Colson P., Houssier C. // FEBS Lett.— 1989.— Vol. 257.— P. 141—144.
15. Duke R. C., Chervenak R., Cohen J. J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1983.— Vol. 80.— P. 6361—6365.
16. Farzaneh F., Shall S., Johnstone A. P. // FEBS Lett.— 1985.— Vol. 189.— P. 62—65.
17. Heck M. M. S., Earnshaw W. C. // J. Cell Biol.— 1986.— Vol. 103.— P. 2569—2581.
18. Hutchison N., Weintraub H. // Cell.— 1985.— Vol. 43.— P. 471—482.
19. Icard-Liepkalns C., Doly J., Macieira-Coelho A. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1986.— Vol. 141.— P. 112—123.
20. Johnstone A. P. // Europ. J. Biochem.— 1984.— Vol. 140.— P. 401—406.
21. Kaminskas E., Li J. C. // Biochem. J.— 1989.— Vol. 261.— P. 17—21.
22. Kaufman S. H. // Cancer Res.— 1989.— Vol. 49.— P. 5870—5878.
23. Kiyama R., Oishi M., Kanda N. // Exp. Cell Res.— 1989.— Vol. 183.— P. 239—244.
24. Kunisada T., Yamagishi H. // J. molec. Biol.— 1987.— Vol. 198.— P. 557—565.
25. Maurer B. J., Lai E., Hamkalo B. A. et al. // Nature.— 1987.— Vol. 327.— P. 434—437.
26. North G. // Ibid.— 1989.— Vol. 316.— P. 394—395.
27. Prasad K. V. S., Greer W. L., Severini A., Kaplan J. G. // Cancer Res.— 1987.— Vol. 47.— P. 5397—5400.
28. Ralph R. K., Schneider E., Rattray S. // J. theor. Biol.— 1988.— Vol. 135.— P. 127—129.
29. Yoshioka A., Tanaka S., Riraoka O. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1987.— Vol. 146.— P. 258—264.
30. Zannis-Hadjopoulos H., Chapelinsky A. V., Martin R. G. // J. molec. Biol.— 1983.— Vol. 65.— P. 599—607.
31. Zhang I. H., Mui S. C., Todt J. C., Strauses P. R. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— Vol. 83.— P. 5871—5874.

Поступила 15.02.91

ON THE PHENOMENON OF GENOME COMPARTMENTALIZATION IN NORMAL AND TUMORAL CELLS

M. M. Zaboikin, R. P. Alekhina, A. V. Lichtenstein

Institute of Carcinogenesis, All-Union Oncology Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Intact cell nuclei (or whole cell lysates) were immobilized on Celite and extracted gradually with gradients of NaCl, LiCl-urea and temperature. Contrary to the notion of DNA integrity and continuity within chromosomes, a heterogenous spectrum of DNA fragments of large size was obtained, adhesion of which

to the nuclear interior widely varied. Similar chromatographic patterns of DNA were observed in analysis of various origin cells both in normal animal tissues and in malignant cells (Djungarian hamster fibroblasts transformed by SV40). Possible artefacts of apparent genome fragmentation caused by radioactive precursors or hydrodynamic shearing were checked up and ruled out as well as endogenous nucleases appear not to be involved in the phenomenon observed. DNA end-labelling *in situ* enabled to reveal pre-existence of DNA fragments in isolated nuclei.

© А. А. Карелин, 1991

УДК 576.385.5.153.4

А. А. Карелин

РОЛЬ «СИГНАЛЬНОГО» АТФ КАК ВТОРИЧНОГО МЕССЕНДЖЕРА В ТРАНСМЕМБРАННОЙ ПЕРЕДАЧЕ ПОЛИПЕПТИДНЫХ СИГНАЛОВ К РОСТУ И КЛЕТочНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

Институт хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

Изучение молекулярных механизмов трансмембранной передачи сигналов, контролирующей рост и дифференцировку нормальных клеток человека и животных, является одной из фундаментальных проблем современной биологии [28].

В последние 30—40 лет был открыт новый класс гормоноподобных веществ — полипептидные факторы роста (ПФР), вовлеченные в пролиферацию, дифференцировку и трансформацию многих типов клеток [16]. Этот новый класс белковых регуляторов поддерживает рост, развитие и дифференцировку клеток [15].

ПФР вовлекаются в широкий круг физиологических и патологических процессов. Эти процессы включают эмбриогенез, рост, развитие, избирательное переживание клеток, гемопоэз, тканевую репарацию, иммунные ответы, атеросклероз, неоплазию [28]. Были установлены важная взаимосвязь и структурная гомология между ПФР или их рецепторами и продуктами онкогенов [14, 17, 19, 33]. Однако неизвестно, каким образом информационные сигналы, передаваемые различными ПФР и родственными им продуктами онкогенов, пересекают гидрофобный барьер плазматической мембраны (ПМ) клетки через стадию, в которой осуществляется преобразование комплекса фактор роста (ФР) — рецептор или онкопротейн — рецептор.

В начале 80-х годов неожиданным оказалось, что рост трансформированных клеток может быть конститутивным проявлением каких-то элементов, присущих нормальному пути передачи митогенного сигнала в клетку [19, 34]. Такими элементами являются собственно сам ФР, мембранный рецептор, некий преобразователь (усилитель) сигналов на ПМ. Это означает, что один из механизмов трансформации клетки может работать на вершине регуляторного пути передачи сигнала: мутационно-измененный рецептор для ФР ведет себя так, словно он конститутивно связывает свой лиганд, который теперь уже может действовать в качестве онкопротеина [34]. Именно на представлениях о внеклеточных сигналах и их пере-

даче в клетку основывается наше понимание механизма действия онкогенных белков [34].

Однако поиск и обнаружение молекулы-мессенджера, которая бы усиливала или энергетически обеспечивала трансмембранный перенос митогенного сигнала ФР и онкопротеинами, оставались загадочными до начала 80-х годов [1, 22].

В настоящей работе приводятся данные о том, что такой молекулой-мессенджером, которая обеспечивает трансмембранное энергетическое сопряжение пролиферативного стимула на ПМ с ответом клетки, предпочтительно является короткоживущий плазмомембранный «сигнальный» АТФ (ПС-АТФ), генерируемый посредством ПФР рецепторзависимым путем в сопряженном окислительно-восстановительном процессе.

Методика. Объектом исследования были препараты многократно промытых и суспендированных в 0,25 М сахарозе обогащенных плазматическими мембранами частиц (ОПМЧ), изолированных из различных тканей и клеток-мишеней в условиях низкоскоростного центрифугирования (200—400, 400—800, 1000—2000 g) по [27]. Ссылки на методы изоляции ОПМЧ из различных тканей приведены ранее [8].

Суспензии ОПМЧ вносили в 20-миллилитровые сосудики Эрленмейера до общего объема среды 2,4 мл (по 1 мл в каждый сосудик, содержащий 1,4 мл инкубационной смеси) или до общего объема 3,6 мл (по 1,5 мл в каждый сосудик, содержащий 2,1 мл инкубационной смеси). Реакционная смесь содержала в конечной концентрации: 0,04 М трис-НСI-буфер pH 7,5, MgSO₄ — 2,5 мМ, АДФ динатриевая соль — 2 мМ, KH₂PO₄ — 5 мМ; NaF — 20 мМ, NAD·H — 0,01 мМ, β-оксимасляной кислоты натриевая соль — 10 мМ, бычий сывороточный альбумин — 277 мкг/мл, цитохром с — 0,1 мМ, антимидин А — 0,0015 мМ, KCN — 1 мМ, ротенон — 7,61 мкМ, 5¹-фторсульфонил-бензоиладенозин — 0,002 мМ, сахароза — 76 мМ. Обычно один из аналогов АТФ — β, γ-аденилилимидофосфат (AppNp), β, γ-метиленаденозин-5'-трифосфат [App(CH₂)p] или 5'-фторсульфонилбензоиладенозин (FSBA) вносили в реакционную смесь до конечной концентрации 1—2 мкМ. Эти аналоги АТФ использовали для максимального предотвращения распада и утилизации образующегося «сигнального» АТФ путем ингибирования реакций переноса или гидролиза γ-фосфата АТФ мембранно-связанными АТФ-киназами и АТФазами.

Вслед за суспензией ОПМЧ в каждый опытный сосудик быстро вносили ФР, митоген, родственный ФР хемоаттрактант, иммунный ростовой фактор или колониестимулирующий фактор, фактор дифференцировки в концентрации от 1 до 40—50 мкг в объеме 20—25 мкл 2 мМ глицил-глицинового буфера pH 7,5 или в 50 мкл 40 мМ трис-2 мМ глицил-глицинового буфера pH 7,5. В контрольный сосудик в том же объеме, что и в экспериментальный, вносили только буферный раствор. Инкубацию проводили при 30 °С в течение 60 с в условиях постоянного продувания инкубационной смеси кислородом под давлением. Перемешивание смеси проводили путем непрерывного встряхивания, реакцию останавливали замораживанием проинкубированных проб в жидком азоте. Дальнейшие процедуры изоляции и количественного определения АТФ производили, как описано ранее [1, 2, 7, 9].

О стимулируемом ПФР и митогенами накоплении АТФ судили по приросту АТФ в продуктах лиофилизации, полученных после фракционирования объединенного материала из 4—5 образцов, инкубированных в присутствии ПФР, по сравнению с уровнем АТФ из образцов, инкубированных в отсутствие ПФР.

Результаты и обсуждение. В нашей лаборатории впервые было показано, что в процессе трансмембранной передачи регуляторного пептидного сигнала к росту, клеточной пролиферации и дифференцировке от рецепторов ряда ПФР на мембранные эффекторные системы (киназы) в ходе NAD·H-связанного окисления на внешней (плазматической) мембране (ПМ) животной клетки в течение 30—60 с синтезируется ПС-АТФ из АДФ и неорганического фосфата

ПФР, митогены и цитокины, вызывающие накопление АТФ в течение 1 мин инкубации при 30 °С препаратами обогащенных плазматическими мембранами частиц, изолированными из тканей-мишеней при инкубации частиц в среде, содержащей трис-НСl-буфер рН 7,5, АДФ, MgSO₄, неорганический фосфат в процессе NAD⁺-Н-связанного окисления в присутствии (АТФ аналога) [(App(CH₃)₃), AppNHp, FSBA], цитохрома с и кислорода

ПФР, митоген	Ткани и клетки-мишени	Стимулирующий эффект ФР, митоген, АТФ, нмоль на 1 мг белка за 1 мин	Физиологический ответ, функция	Источник литературы
Инсулин	Жировая ткань крысы	3,97	Рост клеток в культуре	[2]
	Скелетные мышцы »	0,350	Транспорт сахаров	
	Печень »	0,041	Транспорт аминокислот	
	Эритроциты человека	0,295	Синтез белка	[8]
	Плацента »	8,250		[9]
	Сердце быка	0,300		
Формилметиониллейцилфенилаланин (FMLP)	Лимфоциты крысы	0,170		[7]
	Перитонеальные полиморфноядерные лейкоциты морской свинки	1,520	Хемотаксис, фагоцитоз, высвобождение лизосомальных ферментов	[4]
Конканавалин А (Con A)	Нейтрофилы человека	16,550		
	Скелетные мышцы крысы	0,092	Стимуляция митогенеза подражает эффектам инсулина	[8, 9]
Соматотропный гормон, СТГ (GH)	Жировая ткань крысы	2,550	Рост, транспорт сахаров	[2, 9]
Фактор роста эпидермиса (EGF)	Плацента человека	7,540	Стимуляция клеточной пролиферации, митогенная активность	[11]
Пролактин	Молочная железа кроликов	1,220	Стимуляция синтеза ДНК, инициация лактации	[12]
Иммуноглобулин Е (IgE)	Тучные клетки крысы	6,300	Секреция гистамина	[8]
Интерлейкин-2 (И-2)	Т-лимфоциты из тимуса крысы	4,580	Стимуляция пролиферации, дифференцировки и киллерной активности	[5]
	Т-лимфоциты периферической крови человека	2,720		
α-Тромбин	Фибробласты из бычьих выйных связок	1,800	Митогенез секреции серотонина	[10]
	Тромбоциты человека	1,170		
Гиротропин-рилизинг гормон (TRH)	Передняя доля гипофиза быка	0,21 — 11,6	Рост клеток GH-типа в культуре, высвобождение соматотропина	[6]
Гранулоцитарные макрофагальные колониестимулирующие факторы:	Макрофаги из воспалительного перитонеального экссудата мышей линии СЗН	7,8	Рост, пролиферация и дифференцировка макрофагов, рост и переживание макрофагов в культуре	
	GM-CSF мыши			
GM-CSF человека		27,5		
Легкие фрагменты фибронектина	Фибробласты из бычьих выйных связок	0,5	Стимуляция пролиферации фибробластов, хемотаксис, рост фибробластов в культуре.	

Примечание. Экспериментальные условия описаны в разделе «Методика». После остановки реакции образцы обычно от 4—5 сосудиков объединяли, замораживали в жидком азоте, затем нагревали при 100 °С 1—2 мин, охлаждали на ледяной бане до 4 °С и центрифугировали при 6000 g в течение 20 мин. Супернатанты подвергали ионообменной хроматографии на колонках со смолой Дауэкс — 1×8 (Cl⁻, 100—200 меш) [1]. АТФ элюировали 6—8,5 мл 0,1 н.НСl. Элюаты лиофилизировали до полного высушивания, затем содержимое растворяли в 1 мл 0,04 М трис-НСl-буфере, рН 7,5 и содержание АТФ определяли по [24].

в концентрации 10^{-9} — 10^{-8} М (см. таблицу). Предположительно синтез плазмомембранного сигнального АТФ осуществляется электрохимическим [Na⁺] градиентом Δμ Na в ходе Na⁺/H⁺-обменного ионотранслоцирующего фосфорилирования [3, 7, 10].

Инсулин, который можно рассматривать как ФР, гормон роста, другие ПФР, такие, как EGF, IL-2, α-тромбин, пролактин, стимулятор роста клеток GH-типа TRH, митогены Con A, фитогемагглютинин, родственные ПФР хемотактанты (FMLP), колониестимулирующие факторы (мышинный GM-CSF и человеческий GM-CSF), легкие фрагменты фибронектина, воздействуя на свои

специфические мембранные рецепторы клеток-мишеней, приводили к одному итогу — возрастанию содержания АТФ в первую минуту инкубации при вышеуказанных условиях.

Следует особо подчеркнуть, что образование короткоживущего ПС-АТФ на внешней мембране животной клетки давали главным образом те ПФР, рецепторы которых обладали тирозинкиназной активностью [21, 22]. Хотя эта закономерность прослеживалась не всегда и не для всех ПФР и митогенов, все же феномен синтеза «сигнального» АТФ на ПМ был доминирующим для такого типа сигналов и их рецепторов.

Тирозинспецифическое фосфорилирование

(ТСФ) — относительно редкая форма модификации белков (менее 0,1 % фосфатных групп присоединено к остаткам тирозина в белках нормальных клеток) [29]. Тем не менее ТСФ играет ключевую роль в активации покоящихся клеток посредством рецепторов клеточной поверхности для EGF, инсулина, IGF-1, RDGF, GM-CSF и в трансформации клеток посредством различных ретровирусных онкогенов, таких, как *v-abl*, *v-erb*, *v-fes/pps*, *v-gr*, *v-src* и *v-yes* [13, 20]. Ниже приведены критерии для оценки роли АТФ в качестве вторичного мессенджера ФР, митогенов, стимуляторов клеточной пролиферации и дифференцировки.

Критерии для оценки роли АТФ в качестве вторичного мессенджера ФР, митогенов, стимуляторов клеточной пролиферации: I. АТФ-мессенджер должен генерироваться в ответ на опосредуемый рецептором стимул к росту, пролиферации, митогенезу, хемотаксису и т. д. для активации рецепторного фосфорилирования (самофосфорилирования) и фосфорилирования мишени-протеина; II. Добавление АТФ к пермеализованным клеткам, изолированным из различных источников, должно воспроизводить или усиливать эффект ФР, цитокинов, митогенов, стимуляторов клеточной пролиферации, а добавление аналога АТФ АррNPr должно ингибировать этот эффект; III. Специфический ингибитор протеинкиназ FSBA, добавленный к инкубационной среде, содержащей суспензии ОПМЧ, АДФ, Mg^{2+} , неорганический фосфат (Φ_n), NAD·H, цитохром с и O_2 , увеличивает продукцию мембранно-связанного «сигнального» АТФ в клетках-мишенях в ответ на опосредуемый рецептором митогенный стимул к росту и пролиферации; IV. Биохимический ответ на регуляторы пептидных сигналов к росту и пролиферации локализован только в тех клетках-мишенях, в которых есть соответствующий высокоспецифический рецептор и физиологический ответ является АТФ-зависимым.

Зачем нужно образование сигнального АТФ на внешней мембране животной клетки в ответ на действие многих ПФР?

Известно [25, 32], что опухолевый промотор форболовый эфир и ФР обычно действуют согласованно и синергетически усиливают пролиферацию клеток. Бомбезин, вазопрессин, рилизинг-фактор гастрина, нейромедины [28], а также опухолевые промоторы, такие, как форлескин, телеоцидин, линглитоксин А, аплизитоксин, жирные кислоты, метиловые эфиры жирных кислот, хлороформ, CCl_4 , бензол, толуол, желчные кислоты, палитоксин, бензиламин, какодилат, генерируют продукцию Ins 1, 4, 5 P_3 и DG и активируют протеинкиназу С (PKC), т. е. действуют через Ins 1, 4, 5 $P_3 \rightarrow DG \rightarrow PKC$ -сигнальный путь [18]. Однако синергетические взаимодействия PKC и рецепторных тирозинкиназ представляют проблему, которая еще не решена [25].

Инсулин EGF, IGF-1, M-CS F-1, GM-CSF не вызывают расщепления $PtdIns$ 4,5 P_2 . Однако все они активируют рецепторную тирозинкиназу и вызывают продукцию ПС-АТФ. Продукт ферментативного гидролиза $PtdIns$ 4,5 P_2 диацилглицерин (DG) — активатор PKC — имеет очень короткий, мимолетный период жизни (около 1 мин). PKC проявляет свою активность в клетке только в

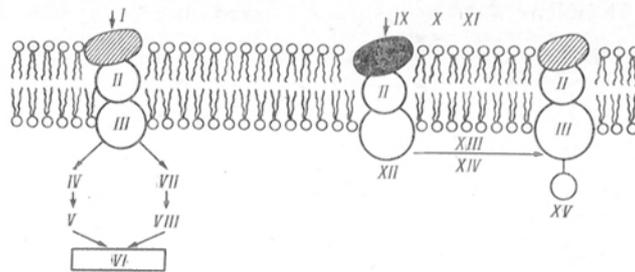


Рис. 1. Активация ключевого мембранного протеина PKC происходит при его фосфорилировании с участием АТФ-Mg, которое осуществляется при посредстве полипептидных факторов роста и гормонов, таких, как инсулин, IGF-1, EGF, GM-CSF, [30].

I — бомбезин; II — Gr; III — PKC; IV — Ins 1,4,5 P_3 ; V — мобилизация Ca^{2+} ; VI — физиологическая реакция; VII — DG; VIII — активация PKC; IX — EGF; X — инсулин; XI — CSF-1; XII — активация тирозинкиназы; XIII — АТФ; XIV — Mg^{2+} ; XV — P.

течение очень короткого периода времени, в то же время последствия активации этого фермента для функции клетки, ее роста и трансформации необычайно стойки [23].

Можно предположить, что пролонгирующая, поддерживающая или усиливающая активация ключевых регуляторных белков ПМ, таких, как PKC, вызванная вышеперечисленными опухолепромоторами, может осуществляться через механизм рецепторного ТСФ с участием АТФ-Mg [30], инициально генерируемого на ПМ посредством взаимодействия ПФР со своими рецепторами (рис. 1 и 2). Эта активация мембранного тирозинспецифического энзиматического фосфорилирования может играть роль в превращении нормальной клетки в опухолевую [31].

Учитывая, что многие рецепторы ПФР и продукты ракового гена обладают способностью активировать протеин (тирозин)киназы, а регуляция их активирования за счет самофосфорилирования и фосфорилирования мишени-протеина на ПМ имеет прямое отношение к размножению клеток, их разделению и подвижности, становится очевидной связь образования ПС-АТФ под действием ПФР с процессом онкогенеза. Возможно, что в цепи событий, передающих сигналы ПФР и гормонов пролиферации на пути от ПМ к ядру, образование ПС-АТФ является наиболее ранним, первоначальным и быстроразвивающимся событием.

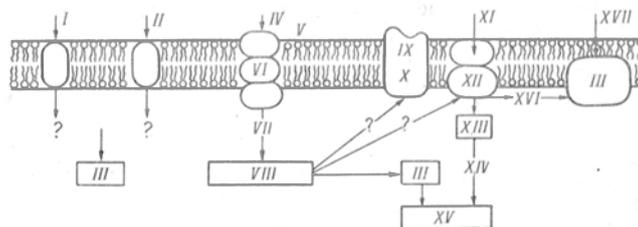


Рис. 2. Стимуляция клеточной активности и пролиферации в процессе передачи сигналов через ПМ Т-клеток [26].

П.-2, взаимодействуя с рецептором, активирует тирозинспецифические киназы и продуцирует ПС-АТФ. Фосфорилирование с ее участием мембранных протеинов, включая PKC (?) и антигенов CD4 и CD8, приводит к активации Т-клеток. Опухолепромотор 12-0-тетрадеканонил-форбол-13-ацетат (ТРА) прямо и устойчиво активирует PKC. I — П.-1; II — LFA; III — PKC; IV — факторы роста; V — П.-2 (TCGF); VI — GP; VII — активация тирозинкиназы; VIII — тирозинкиназа; IX — X — Tl CD8; XI — сигнал; XII — PKC; XIII — IP_3 ; XIV — освобождение Ca^{2+} ; XV — активация TC-клеток; XVI — DG; XVII — ТРА.

1. Карелин А. А. // Вopr. мед. химии.— 1981.— № 5.— С. 679—685.
2. Карелин А. А., Марчук А. И., Рыгвинский С. С. // Там же.— 1983.— № 6.— С. 99—105.
3. Карелин А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С. и др. // Там же.— 1985.— № 2.— С. 111—117.
4. Карелин А. А., Глоба А. Г., Демидова В. С., Марчук А. И. // Там же.— 1986.— № 5.— С. 93—98.
5. Карелин А. А., Демидова В. С., Глоба А. Г. и др. // Там же.— 1989.— № 3.— С. 120—124.
6. Карелин А. А., Шумова Е. А., Глоба А. Г. и др. // Там же.— 1991.— № 1.— С. 65—67.
7. Карелин А. А. // Вестн. АМН СССР.— 1983.— № 7.— С. 74—85.
8. Карелин А. А. // Там же.— 1986.— № 8.— С. 77—90.
9. Карелин А. А. // Там же.— 1987.— № 7.— С. 35—41.
10. Карелин А. А., Марчук А. И., Писаржевский С. А. и др. // Гематол. и трансфузиол.— 1987.— № 5.— С. 25—28.
11. Карелин А. А., Николаев В. И., Николаева Л. Ю., Писаржевский С. А. // Бюл. eksper. биол.— 1986.— № 12.— С. 709—712.
12. Карелин А. А., Николаев В. И., Писаржевский С. А. и др. // Луши. и гин.— 1987.— № 5.— С. 40—42.
13. Bishop J. M. // Ann. Rev. Biochem.— 1983.— Vol. 52.— P. 301—354.
14. Bishop J. M. // Cell.— 1985.— Vol. 42.— P. 23—38.
15. Bradshaw R. A., Rubin J. S. // J. Supramol. Struct.— 1980.— Vol. 14, N 2.— P. 183—199.
16. Callissano P. // Chem. Today.— 1989.— Vol. 7.— P. 13—14.
17. Downward J., Yarden Y., Mayers E. et al. // Nature.— 1984.— Vol. 307.— P. 521—527.
18. Fan T., Da Silva C., Huang X. P., Castagna M. // FEBS Meeting, 20-th: Abstracts.— Budapest, 1990.— P. 117 (S—TU 2—07).
19. Heldin C.-H., Westermark B. // Cell.— 1984.— Vol. 37.— P. 9—20.
20. Hunter T., Cooper J. A. // Ann. Rev. Biochem.— 1985.— Vol. 54.— P. 897—930.
21. Karelin A. A. // International Congress of Biochemistry, 14-th, Prague, 1988.— P. 164.
22. Karelin A. A. // FEBS Meeting, 20-th: Abstracts.— Budapest, 1990.— P. 271 (P—TH—129).
23. Kikkawa U., Nishizuka Y. // Biochem. Soc. Trans.— 1987.— Vol. 15, N 1.— P. 124—125.
24. Kornberg A. // J. biol. Chem.— 1950.— Vol. 182.— P. 779—793.
25. Nishizuka Y. // Trends biochem. Sci.— 1984.— Vol. 9, N 4.— P. 163—166.
26. Nishizuka Y. // FEBS Meeting, 20-th: Abstracts.— Budapest, 1990.— P. 116 (S—Tu 2—01).
27. Rall T. W., Sutherland E. W. // J. biol. Chem.— 1958.— Vol. 232.— P. 1065—1076.
28. Rozengurt E. // Science.— 1986.— Vol. 234, N 4773.— P. 161—166.
29. Sefton B. M., Hunter T., Beemon K., Eckhart W. // Cell.— 1980.— Vol. 20.— P. 807—816.
30. Sharoni Y., Luzinizer I., Levy J. // FEBS Meeting, 20-th: Abstracts.— Budapest, 1990.— P. 274 (P—TH—149).
31. Sharoni Y., Teurstein I., Levy J. // Biochem. biophys. Res.— Commun.— 1986.— Vol. 134, N 2.— P. 819—823.
32. Tsuda T. // Kobe J. med. Sci.— 1987.— Vol. 33, N 1.— P. 1—18.
33. Weinberg R. A. // Science.— 1985.— Vol. 230.— P. 770—776.
34. Weinberg R. A. // Trends biochem. Sci.— 1984.— Vol. 9, N 4.— P. 131—133.

Поступила 20.02.91

IMPORTANCE OF SIGNAL ATP AS A SECONDARY MESSENGER OF TRANSMEMBRANE TRANSDUCTION OF POLYPEPTIDE SIGNAL TO CELL GROWTH AND DIFFERENTIATION

A. A. Karelin

A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Experimental and literature data, concerning the formation and utilization of short-living membrane bound ATP on plasmatic membrane of mammalian cells, are discussed. This type of ATP is produced in the fraction of particles enriched

with plasmatic membranes by means of receptor-dependent mechanism coupled with redox potential. Role of the ATP in mediation of the «signal» transduction through plasmatic membrane by a number of polypeptide factors of growth, mitogenes, by stimulators of cell proliferation and differentiation is considered. Formation of short-living «signal» ATP on plasmatic membrane, as it is particularly emphasized, is related to activation of tyrosine specific phosphorylation catalyzed by membrane-bound tyrosine kinases. The criteria corroborating importance of the plasmatic membrane ATP as early messenger transducing signals to cell growth, proliferation, differentiation and transformation are discussed. Interrelation is considered between formation of the signal transducing ATP from ADP and P_i on plasmatic membrane of mammalian cell and oxidation of NADH coupled with aerobic phosphorylation and Na⁺/H⁺ exchange.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 618.19-006.6-085.277.3-036.8-07

Е. Н. Корнева, В. М. Щербаков, Л. В. Кравченко, Б. Ш. Чиквашвили, В. М. Девиченский, С. Ю. Семенов, В. П. Легягин

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛАССИЧЕСКОЙ И МОДИФИЦИРОВАННОЙ СХЕМ КУПЕРА ПРИ ХИМИОТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Всесоюзный научный центр молекулярной диагностики и лечения Минздрава СССР, Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР, Москва

При онкологических заболеваниях молочной железы эффективность химиотерапевтического воздействия во многом определяет общий прогноз лечения [7]. При лечении рака молочной железы в настоящее время широко используется химиотерапевтическая схема Купера, предусматривающая введение больному в течение 22 дней следующих препаратов: винкристина (1 мг внутривенно в 1, 8, 15 и 22-й дни), 5-фторурацила (750 мг внутривенно в 1, 8, 15 и 22-й дни), метотрексата (40 мг внутривенно в 1, 8, 15 и 22-й дни), циклофосфана (200 мг внутримышечно каждый день), преднизолон (30 мг перорально 3 раза в день). При использовании такой схемы обычно происходит значительная регрессия опухоли, однако часто наблюдаются и побочные эффекты, связанные главным образом с применением циклофосфана, которые выражаются в частичной алопеции волосистой части головы, тошноте, рвоте, головокружении, лейкопении и лимфопении.

Как известно [6], циклофосфан быстро метаболизируется в печени с образованием активных метаболитов, взаимодействующих как с опухолевыми, так и с нормальными клетками. Благодаря этому кажется очевидной невозможность разнонаправленной регуляции терапевтического и токсического действия этого препарата, что подтверждено целым рядом работ [2, 8, 10]. Это означает, что при увеличении терапевтического эффекта циклофосфана одновременно возрастает его токсическое действие, и наоборот. Поэтому наша стратегия состояла в том, чтобы видоизменением существующей схемы добиться уменьшения токсического эффекта без существенного снижения терапевтического действия циклофосфана. Одной из основных предпосылок для реше-

ния этой задачи послужил экспериментально установленный факт, что при применении циклофосфана один из его активных метаболитов — акролеин — резко понижает в клетке уровень глутатиона [18], который, как известно, служит компонентом одной из основных защитных систем организма [5]. При этом установлено, что сам акролеин играет главную роль в индуцируемой применением циклофосфана токсичности и меньшую роль в терапевтическом действии этого препарата [19]. Уменьшение клеточного уровня глутатиона под воздействием акролеина не имеет линейной концентрационной зависимости и носит синергический характер [9]. На основании этих данных мы предположили, что для уменьшения токсического действия циклофосфана необходимо увеличить в используемой химиотерапевтической схеме интервалы между применением этого препарата и одновременно увеличить его дозы. Этим предполагалось обеспечить перед каждым новым введением циклофосфана высокий уровень глутатиона в клетке и тем самым снизить токсичность препарата. Для сравнения эффективности классической и модифицированной схем Купера мы определяли значения константы скорости выведения акролеина из организма, расчетные значения терапевтического эффекта применения циклофосфана, отношение концентрации неметаболизированного препарата к его общей дозе в различные сроки в процессе проведения химиотерапевтических курсов больным.

Методика. Содержание акролеина в слюне больных определяли спустя 5, 10, 15, 20, 30, 45, 50 и 90 мин после введения циклофосфана. Ранее была установлена положительная линейная корреляция между содержанием акролеина в крови и слюне после введения циклофосфана [20]. Объем слюны для определения составлял 0,3–2 мл. Методика определения акролеина описана ранее [13].

Неметаболизированный циклофосфан в моче больных определяли спустя 1,5 ч после введения препарата с помощью метода хромато-масс-спектрометрии [11].

Расчет константы скорости выведения акролеина производили, исходя из однокачественной модели элиминации циклофосфана и его метаболитов [4]. Значения расчетного терапевтического эффекта (ТЭ) применения циклофосфана были определены в соответствии со следующим выражением [24]:

$$TЭ = S/H,$$

где S — площадь под фармакологической кривой; H — амплитуда фармакокинетической кривой.

Статистическую обработку данных проводили на персональном компьютере «Hewlett Packard 85» (США) с помощью критерия t Стьюдента. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены диаграммы изменения значений кон-

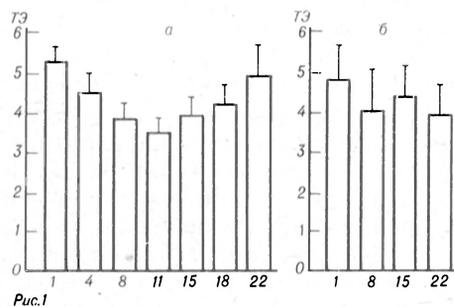


Рис. 1. Динамика изменений расчетного значения ТЭ циклофосфана в процессе применения классической (а) и модифицированной (б) схем Купера.

Здесь и на рис. 2 и 3. По оси абсцисс — длительность лечения, дни.

станты выведения акролеина в слюне больных при химиотерапии по классической (а) и модифицированной (б) схемам Купера. При анализе классической схемы из 22 введений циклофосфана больным были выбраны 7 (1, 4, 8, 11, 15, 18 и 22-й дни), а при анализе модифицированной схемы — все 4 введения препарата. Из рис. 1 следует, что достоверное снижение значений константы выведения акролеина при проведении классической схемы Купера происходит уже на 8-й день курса, тогда как при проведении модифицированной схемы химиотерапии — лишь на 15-й день. К 22-му дню процент снижения константы выведения акролеина к начальному уровню для первой схемы составляет 24, а для второй — только 11. Как было установлено ранее, выведение акролеина из организма происходит путем его ферментативного или неферментативного взаимодействия с восстановленным глутатионом [1, 18]. Поэтому наблюдаемое снижение константы скорости выведения акролеина может быть связано с индуцируемым циклофосфаном [8] уменьшением уровня глутатиона в клетке. Различия в динамике изменения величины константы выведения акролеина при проведении химиотерапии по классической и модифицированной схемам указывает на то, что при использовании второй схемы вызванное циклофосфаном снижение уровня глутатиона в клетке менее выражено, чем при использовании первой схемы. Вследствие того что глутатион выполняет в организме функции детоксикации, следует ожидать, что при использовании модифицированной схемы Купера в сравнении с классической деструктивное воздействие активных метаболитов циклофосфана и других используемых противоопухолевых препаратов на ферментные системы печени менее выражено.

На рис. 2 представлены диаграммы динамики изменения расчетного терапевтического эффекта применения циклофосфана при проведении больным химиотерапии по классической (а) и модифицированной (б) схемам Купера. Как видно, в процессе проведения классической схемы значения терапевтического эффекта сначала снижаются, к 11-му дню достигают минимальной величины (65 % от исходного значения), а затем возрастают и к 22-му дню практически соответствуют контрольному уровню. В процессе применения модифицированной схемы Купера достоверного снижения значений терапевтического эффекта не наблюдалось. Абсолютные значения терапевтического эффекта по модифицированной

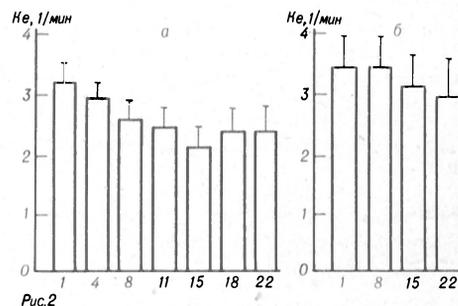


Рис. 2. Динамика изменений кажущегося значения константы выведения (K_e , 1/мин акролеина) при лечении по классической (а) и модифицированной (б) схемам Купера.

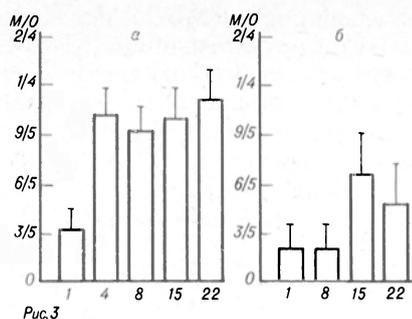


Рис. 3. Динамика изменений отношения (М/О) содержания циклофосфана в моче к общей дозе препарата при проведении классической (а) и модифицированной (б) схемам Купера.

схеме Купера были приблизительно равны значениям терапевтического эффекта в 1-й и 22-й дни проведения классической схемы. Эти данные свидетельствуют о преимуществах второй схемы перед первой.

На рис. 3 представлена динамика изменений отношения неметаболизированного циклофосфана к его исходной дозе в процессе проведения больным классической (а) и модифицированной (б) схем Купера. Это отношение может служить показателем степени повреждения ферментных систем печени, участвующих в метаболизме циклофосфана, при химиотерапевтическом воздействии.

Применение циклофосфана вызывает у экспериментальных животных значительное уменьшение активности целого ряда ферментов печени [12, 16]. Этот процесс связан с тем, что в результате биоактивации циклофосфана образуются высокорекреционные метаболиты — акролеин, фосфорамид и др., которые вызывают разрушение биомолекул. Применение циклофосфана вызывает уменьшение активности цитохрома Р-450 [16], NADPH-цитохром Р-450-редуктазы [15], глутатион-S-трансферазы [21], альдегиддегидрогеназы [17], алкогольдегидрогеназы [14]. Некоторые из этих ферментов участвуют в метаболизме циклофосфана. Так, цитохром Р-450 катализирует начальный этап активации циклофосфана до таутомерной формы 4-гидроксициклофосфан/альдофосфан [3], глутатион-S-трансферазы осуществляют конъюгацию электрофильных метаболитов циклофосфана с глутатионом [23], альдегиддегидрогеназа катализирует превращение альдофосфана в карбоксифосфан — основной путь детоксикации циклофосфана [22], алкогольдегидрогеназа ответственна за свою меньшую роль в детоксикации — восстановлении альдофосфана до алкоформы [14].

Представленные данные свидетельствуют о том, что при повторном применении циклофосфана его метаболизм может существенно замедлиться. При применении классической схемы отношение неметаболизированного циклофосфана к его исходной дозе увеличивается более чем в 3 раза уже к 4-му дню химиотерапии, тогда как соответствующее значение для модифицированной схемы остается неизменным до 8-го дня и возрастает только к 15-му дню. Абсолютные значения величины отношения существенно меньше при проведении модифицированной схемы по сравнению с классической. Эти данные свидетельствуют о том, что

ферментные системы печени, участвующие в биотрансформации циклофосфана, повреждаются значительно меньше при использовании модифицированной схемы Купера по сравнению с классической.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alarcon R. A. // *Cancer Treatm. Rep.*— 1976.— Vol. 60.— P. 327—335.
2. Alberts D. S., Van Wetters D. T. // *Cancer Res.*— 1976.— Vol. 36.— P. 2785—2790.
3. Booth J., Bouland E., Sims P. // *Biochem. J.*— 1961.— Vol. 79.— P. 516—524.
4. Brock N., Gross R., Hohesrt H. J. et al. // *Cancer Res.*— 1971.— Vol. 27.— P. 1512—1529.
5. Chasseaud L. F. // *Advanc. Cancer Res.*— 1979.— Vol. 29.— P. 175—274.
6. Colvin M., Hilton J. // *Cancer Treatm. Rep.*— 1981.— Vol. 65.— P. 89—95.
7. Friedman O. M., Hiles A., Colvin M. // *Advances in Cancer Chemotherapy* / Ed. A. Rosowsky.— New York, 1979.— P. 143.
8. Gurtoo H. L., Hipkens J. H., Sharma S. D. // *Cancer Res.*— 1981.— Vol. 41.— P. 3584—3591.
9. Haenen G. R. M. et al. // *Biochem. Pharmacol.*— 1988.— Vol. 37.— P. 1933—1938.
10. Hart L. G., Adamson R. H. // *Arch. int. Pharmacodyn.*— 1969.— Vol. 180.— P. 391—401.
11. Hong P. S., Chan K. K. // *Biomed. environ. Mass. Spectromet.*— 1987.— Vol. 14.— P. 167—172.
12. Honjo A. L. et al. // *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*— 1988.— Vol. 61.— P. 149—165.
13. Leach C. L. et al. // *Toxicol. Lett.*— 1987.— Vol. 39.— P. 189—198.
14. Le Blanc G. A., Waxman D. J. // *Drug Metab. Rev.*— 1989.— Vol. 20.— P. 385—441.
15. Marrinello A. J., Gurtoo H. L., Struck R. F., Paul B. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1978.— Vol. 83.— P. 1347—1353.
16. Marrinello A. J., Berrigan M. J., Struck R. F. // *Ibid.*— 1981.— Vol. 99.— P. 399—406.
17. Mitchel D. Y. et al. // *Drug. Metab. Dispos.*— 1988.— Vol. 16.— P. 37—42.
18. Okto Y., Ormstad K. // *Arch. Toxicol.*— 1985.— Vol. 57.— P. 99—103.
19. Powers J. E., Sladek N. E. // *Cancer Res.*— 1983.— Vol. 43.— P. 1101—1106.
20. Richter W. A., Bykadi G., Norman E. J. // *J. clin. Pharmacol.*— 1981.— Vol. 21.— P. 461—465.
21. Scott T. R. et al. // *Biochem. int.*— 1988.— Vol. 16.— P. 439—442.
22. Sladek N. E. // *Pharmacol. Ther.*— 1988.— Vol. 37.— P. 301—355.
23. Sladek N. E., Manthey C. L., Maki P. A. // *Drug. Metab. Rev.*— 1989.— Vol. 20.— P. 697—720.
24. Struck R. P., Alberts D. S. // *Cancer Treatm. Rep.*— 1984.— Vol. 68.— P. 23—25.

Получила 19.02.91

EFFICIENCY OF ROUTINE AND MODIFIED CUPER PROCEDURES USED IN CHEMOTHERAPY OF MAMMARY GLAND TUMOR

E. N. Korneva, V. M. Scherbakov, L. V. Kravchenko, B. Sh. Chikvashvili, V. M. Devichinsky, S. Yu. Semenov, V. P. Letyagin

All-Union Research Centre of Molecular Diagnosis, Ministry of Public Health of the USSR, All-Union Oncology Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Efficiency of routine and modified Cuper procedures was studied after evaluation in saliva and urine of women with mammary gland tumor of the following parameters: alterations in dynamics of acrolein excretion with saliva, dynamics of alterations in calculated therapeutic doses of cyclophosphane administered using these procedures, dynamics of the ratio between non-metabolized cyclophosphane and its initial level in urine of the patients. Analysis of the data obtained suggest that the liver tissue enzymatic systems, involved in biotransformation of cyclophosphane, were distinctly less impaired during the modified Cuper procedure as compared with the

routine course, thus corroborating advantages of the modified procedure used in chemotherapy of patients with mammary gland tumor.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

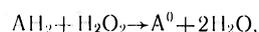
УДК 616.36-018.1:576.385.5]-02:615.277.4]-076.9

В. П. Курченко, И. Исмахил, И. В. Пронская

РОЛЬ КАНЦЕРОГЕННЫХ АМИНОБИФЕНИЛОВ В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ГЕПАТОЦИТОВ

Белорусский университет им. В. И. Ленина, Минск

Введение животным фенобарбитала, 3-метилхолантрена и ряда других ксенобиотиков вызывает увеличение содержания в гепатоцитах крысы ферментных систем биотрансформации чужеродных веществ, рост эндоплазматического ретикулума и другие проявления, характерные для зрелых дифференцированных гепатоцитов [1]. При этом в процессе дифференцировки гепатоцитов наблюдается снижение уровня рецепторов к индукторам пролиферации: эпидермальному фактору роста, стероидным гормонам [4, 24]. Среди ксенобиотиков многие аминобифенилы являются проканцерогенами, требующими метаболической активации для проявления канцерогенных свойств [14]. Одним из возможных путей их метаболической активации является пероксидазное окисление, в ходе которого все гемопротеины катализируют реакции окисления аминобифенилов по уравнению:



где AH_2 — донор водорода [9].

Образующиеся химически активные интермедиаты могут вызывать модификацию биомолекул и как следствие приводить к инаktivации ферментов, повреждению мембран, мутациям, влияя на пролиферативный процесс.

Широкое использование канцерогенных аминобифенилов в современных промышленных технологиях (производство красителей, резины, клеев, пластмасс и др.) обуславливает необходимость детального исследования влияния этих веществ на биохимические защитные системы организма, ответственные за его адаптацию и резистентность к химическим факторам окружающей среды [2]. В связи с этим в настоящей работе проведено сравнительное исследование действия аминобифенилов с убывающей канцерогенностью: сильного канцерогена бензидина (БД), слабых канцерогенов 3,3'-диметоксибензидина (ДМОБД),

3,3'-диметилбензидина (ДМБД) и неканцерогенного 3,3' 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБД) — на систему микросомального окисления, антиоксидантную систему, активность глутатионзависимых ферментов — систем, характеризующих зрелость гепатоцитов.

Методика. Опыты проводили на беспородных крысах-самках массой 150–200 г. Ксенобиотики вводили перорально в течение 4 дней в виде суспензии в 0,9% растворе NaCl в дозе 120 мг на 1 кг массы животного. Микросомальную фракцию печени выделяли дифференциальным центрифугированием [10]. Содержание цитохрома P-450 и b_5 определяли по [17]. Активность НАДФ-Н-цитохром P-450 редуктазы измеряли по восстановлению цитохрома c [23]. Скорости монооксигеназных реакций О-деэтилирования 7-этоксирезорфурина (7-ЭР) и О-деалкилирования пентоксирезорфурина (ПР) оценивали по образованию резорфурина [20], гидроксилирование андростендиона — по [21]. Содержание изоформ цитохрома P-450 в микросомах определяли методом ракетного иммуноэлектрофореза [19]. Пероксидазную активность микросом и гемоглобина, цитохромов b_5 и P-450 исследовали по [6]. В надосадочной фракции, полученной после выделения микросом, определяли количество восстановленного глутатиона [22] и активность супероксиддисмутазы (СОД) [16], каталазы [12], глутатионпероксидазы (ГП) [8], НАДФ-Н-глутатионредуктазы (ГР) [5], глутатион-S-трансферазы (ГТ) [13] спектрофотометрически; белок определяли по [15].

Результаты и обсуждение. При изучении проблемы взаимосвязи структуры конкретного аминобифенила и характера вызываемого им биологического эффекта на гепатоциты предвзвешенно были получены кинетические параметры пероксидазного окисления БД и его производных, имеющих различные заместители в положении 3 и 5, микросомами печени и рядом гемопротеинов: цитохромами P-450 и b_5 , гемоглобином, пероксидазой хрена в присутствии перекиси водорода. Из табл. 1 видно, что введение двух метильных (ДМБД) заместителей в молекулу бензидина по положению 3 или четырех по положению 3 и 5 (ТМБД) вызывает 3- и 8-кратный соответственно рост отношения констант K_{cat}/K_m , характеризующего эффективность пероксидазного катализа. В то же время окисление этих субстратов гемоглобином, цитохромами b_5 и P-450 ЛМ₂ резко замедляется с введением метильных заместителей. При окислении БД и его производных микросомами печени также наблюдается значительное снижение эффективности пероксидазного катализа с ростом количества метильных заместителей, при этом константа Михаэлиса — Ментен уменьшается в 3 раза. Анализ этих результатов свидетельствует о том, что введение заместителей в молекулу БД вызывает эффективное связывание его производных с цитохромом P-450, но затрудняет их окисление.

Таблица 1

Кинетические параметры пероксидазного окисления БД и его производных рядом гемопротеинов

Препараты	БД			ДМОБД			ДМБД			ТМБД		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Микросомы печени	1,25	4,85	38,8	0,91	1,87	20,5	1,01	2,12	20,9	1,68	1,68	27,7
Цитохром P-450 ЛМ ₂	1,96	6,7	34,2	1,82	0,4	2,15	—	—	—	9,09	2,4	2,6
Цитохром b_5	0,83	0,71	8,6	1,85	0,86	4,6	4,0	1,6	4,0	2,0	0,57	2,9
Гемоглобин	1,43	163,8	1 145	1,04	6,9	66,3	1,17	3,2	27,4	1,02	14,1	138,2
Пероксидаза	1,18	1 320	11 186	0,74	1400	18 918	0,68	2800	41 176	1,09	10 100	92 660

Примечание. I — K_m , $M \cdot 10^{-4}$; II — K_{cat} , s^{-1} ; III — K_{cat}/K_m , $M^{-1} \cdot s^{-1} \cdot 10^{-3}$. Здесь и в табл. 2–4 представлены средние данные 6–8 независимых опытов.

Таблица 2

Характеристика монооксигеназной системы микросом печени крыс, получавших различные аминобифенилы

Препарат микросом	Содержание цитохрома P-450, нмоль/мг белка	Общее содержание цитохрома P-450, нмоль/мг белка	Активность НАДФ-Н-цитохром С-редуктазы, нмоль цитохрома С в 1 мин/мг белка	Содержание цитохрома P-450 _{b+c} , %	Содержание цитохрома P-450 _c , %
Контроль	0,59	0,55	114,0	4	3
БД	0,53	0,8	94,2	3	3
ДМОБД	0,58	0,78	67,2	9,7	11,0
ДМБД	0,59	1,78	74,4	11,0	26,4
ТМБД	0,64	1,18	105,0	3,6	28,9

Ранее было показано [11], что производные бифенила, 2 и 4 позиции которых блокированы галогенами, способны индуцировать систему микросомального окисления печени по фенобарбитальному типу. Блокирование хлором 3, 4, 5 позиций бифенила дает производные, вызывающие метилхолантреновый тип индукции монооксигеназной системы. Смешанный тип индукции присущ производным бифенила, хлорированным по положению 2, 4 и 3, 5 [11, 18]. Можно предположить, что существует взаимосвязь между биотрансформацией аминобифенилов, имеющих в 3 и 5 позициях метильные, а в 4 — аминогруппы, и их индуцирующей активностью в отношении систем метаболизма ксенобиотиков.

Известно, что бифенил является типичным субстратом цитохрома P-450 и не проявляет свойств индуктора монооксигеназной системы [11]. Как видно из табл. 2 и 3, введение животным БД также не вызывает существенных изменений в состоянии монооксигеназной системы. В сравнении с БД у животных, получавших ДМОБД, наблюдается почти двукратное уменьшение активности НАДФ-Н-цитохром-с-редуктазы без изменения удельного содержания цитохромов P-450 и P-450_c (см. табл. 2). В то же время происходит изменение содержания отдельных форм цитохрома P-450. Так, иммунохимически определяемое суммарное содержание цитохрома P-450_b и P-450_c в микросомах возросло до 9,7% от общего содержания P-450 в микросомах (см. табл. 2). Возросла активность микросом при O-деалкилировании ИР и гидроксилировании андростендиона по положению 6β и 16α (см. табл. 3). Этот рост может быть связан с незначительной индукцией молекулярных форм цитохромов P-450_b, P-450_c и P-450_a, проявляющих субстратную специфичность при окислении этих субстратов. Ак-

тивация их метаболизма характерна для индукции фенобарбитального типа.

Замена метоксигрупп в положении 3 на метильные придает ДМБД свойства индуктора смешанного типа. Об этом свидетельствуют иммуноэлектрофоретические исследования, выявившие рост содержания молекулярных форм цитохромов P-450_{b+c} и P-450_c, которые составили 11,0 и 26,4% соответственно от общего содержания цитохрома P-450 в микросомах. Общее содержание цитохрома P-450 возросло в 3 раза по сравнению с контролем (см. табл. 2). Цитохромы P-450_b и P-450_c проявляют субстратную специфичность при гидроксилировании андростендиона в положении 6β и 16α [11]. Как видно из табл. 3, скорость гидроксилирования андростендиона в положении 16α возросла в 8 раз и в положении 6β — в 6 раз. Значительный рост этих активностей также свидетельствует об индукции форм цитохромов P-450_b и P-450_c. Кроме того, наблюдается трехкратный рост скорости гидроксилирования андростендиона в положении 7α, что свидетельствует об индукции цитохрома P-450_a [11], и в 6 раз возросла активность деэтилирования метоксирезорурфина, характерная для цитохрома P-450_a (см. табл. 2) [7].

Введение 4 метильных заместителей в молекулу БД придает ТМБД свойства индуктора метилхолантренового типа. Содержание формы цитохрома P-459, иммунохимически идентичной метилхолантраниндуцируемой форме P-450_a, определенное ракетным иммуноэлектрофорезом, достигло 0,3 нмоль/мг белка и составило 28,9% от общего уровня цитохрома P-450, возросшего в 2 раза по сравнению с контрольными микросомами (см. табл. 2). Изменение содержания цитохрома P-450_b было незначительным. Этот индуктор вызывает рост активности O-деэтилирования 7-ЭР в 10 раз и гидроксилирования андростендиона в положении 6β в 6 раз. Рост этих активностей характерен для индукторов метилхолантренового типа, вызывающих увеличение содержания цитохромов P-450_c и P-450_a [21].

Процесс окисления аминобифенилов в ходе I фазы их метаболизма сопровождается образованием химически активных метаболитов, перекисей и свободнорадикальных форм кислорода (ОН·; НО₂; O₂). Обезвреживание этих продуктов осуществляют соответствующие биохимические защитные системы, важную роль в которых играют ферменты II фазы биотрансформации чужеродных веществ. Среди них большое значение имеют реакции конъюгации с глутатионом, катализируемые ГТ. Из табл. 4 видно, что введение животным изучаемых аминобифенилов индуцирует активность ГТ. В результате действия БД, ДМБД, ДМОБД скорость реакции конъюгации глутатиона с 1-хлор-2, 4-динитробензолом возросла в 1,6—2,2 раза. При этом наблюдается индукция не только ГТ, но и НАДФ-Н-зависимой ГР, восстанавливающей глутатион из его окисленной формы. Активность ГР при введении животным БД, ДМБД, ДМОБД возрастала в 1,9, 2,1 и 2,5 раза соответственно. Тиолдисульфидная редокс-система по-разному реагирует на действие бензидина и его производных. БД вызывает трехкратное снижение уровня восстановленного глута-

Таблица 3

Активность монооксигеназной системы (в нмоль/мин/мг белка) микросом печени крыс при введении аминобифенилов

Препарат микросом	Андростендион			7-ЭР-О-деэтилилаза	МР-диэтилаза	ИР-О-деалкилаза
	7α	16α	6β			
Контроль	1,22	0,1	0,1	0,09	0,04	0,04
БД	1,40	0,17	0,18	0,06	0,05	0,04
ДМОБД	0,57	0,51	0,90	0,09	0,07	0,03
ДМБД	3,40	0,89	0,65	1,27	0,31	0,04
ТМБД	0,94	0,26	1,33	1,10	0,03	0,02

Таблица 4

Активность антиоксидантных и глутатионзависимых ферментов печени крыс, получавших аминобифенилы

Аминобифенил	СОД (мг/мг белка)	ГТ (мг/мг белка)	ГП (мг/мг белка)	Каталаза (мг/мг белка)	СОД (мг/мг белка)	
Контроль	96,3	13,7	125,3	3,81	7,2	1,23
БД	32,0	26,1	203,8	3,73	2,6	0,66
ДМОБД	814,0	34,9	279,8	2,0	4,4	0,93
ДМБД	1050	29,4	202,0	2,37		1,16

тиона по сравнению с контролем. В то же время введение диметоксипроизводного БД (ДМОБД) приводило к 8,5-кратному и диметильного производного (ДМБД) — к 11-кратному росту уровня восстановленного глутатиона (см. табл. 4).

Полученные данные о индукции ферментов II фазы биотрансформации ксенобиотиков показывают, что выраженность индуцирующего влияния аминобифенилов определяется количеством и характером заместителей в молекуле бензидина.

Результаты исследования активностей ферментов антиоксидантной системы цитозольной фракции печени крыс, получавших аминобифенилы, приведены в табл. 4. Анализ данных показывает, что после введения БД наблюдается снижение активности СОД почти в 2 раза, каталазы в 3 раза. Активность ГТ остается в пределах контроля. ДМОБД вызывал аналогичные изменения, однако степень угнетения активности СОД и каталазы оказалась меньшей — в 1,3 и 1,6 раза соответственно по отношению к контролю. После введения животным диметильного производного БД (ДМБД) существенных изменений активностей антиоксидантных ферментов не наблюдалось.

Таким образом, БД существенно снижает активность ферментов антиоксидантной системы, в то время как метилированный по положению 3 БД ощутимого влияния на активность этих ферментов не оказывает.

Суммируя полученные результаты по действию БД на биохимические защитные системы, необходимо отметить, что под его воздействием в гепатоцитах не происходит существенных изменений в микросомальной системе окисления, определяющей I фазу метаболизма этого ксенобиотика. Процесс биотрансформации БД проходит в две стадии [14], во II фазе которого продукты окисления вступают в реакции конъюгации, в том числе и с глутатионом, при этом уровень восстановленного глутатиона резко уменьшается, хотя активность фермента, ведущего его восстановление, возрастает. Наблюдается индукция ГТ, катализирующей этот процесс. Кроме того, происходит резкое снижение активности ферментов антиоксидантной системы.

Введение двух метоксигрупп в молекулу бензидина изменяет характер его воздействия на системы, ответственные за адаптацию и устойчивость гепатоцитов к ксенобиотикам. ДМОБД проявляет свойства слабого индуктора фенобарбитального типа, но при его введении резко уменьшается активность НАДФ-Н-цитохром P-450-ре-

дуктазы (см. табл. 2). Индуцибельность же ГТ и ГР под его влиянием значительно более выражена. При этом активность ферментов антиоксидантной системы уменьшается незначительно, а уровень восстановленного глутатиона возрастает многократно (см. табл. 4). Замена метоксигрупп на метильные в молекуле БД радикально изменяет индуцирующее влияние на ферментные системы метаболизма и детоксикации ксенобиотиков. В отличие от БД ДМБД проявляет свойства индуктора I и II фазы биотрансформации, выраженные в равной степени. Являясь индуктором смешанного типа, ДМБД при введении животным вызывает более чем трехкратный рост уровня цитохрома P-450 (см. табл. 2 и 3), двукратный рост активности ГТ, трехкратный рост активности ГР, более чем десятикратный рост уровня восстановленного глутатиона на фоне незначительных изменений активности антиоксидантных ферментов. Необходимо отметить, что индукция ДМБД этих систем, углубляющих дифференцировку гепатоцитов, приводит к трехкратному снижению уровня связывания эпидермального фактора роста с рецепторами гепатоцитов в результате уменьшения количества рецепторов без изменения константы связывания [3].

Таким образом, аминобифенилы, индуцируя ферменты I и II фазы биотрансформации, существенно изменяют соотношение уровней, активностей и изомимного профиля этих ферментов, свойственных интактным гепатоцитам, углубляют их дифференцировку. Результатом этого является усиление процессов детоксикации как самого индуктора, так и других чужеродных веществ, поступающих в организм.

Авторы выражают благодарность Т. Г. Семак и Е. Е. Ломоносовой за участие в эксперименте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
2. Канцерогенные вещества. — М., 1987. — С. 25—61.
3. Курченко В. П., Федорова Т. А., Родионова Т. Г., Пикудев А. Т. // Цитология. — 1989. — Т. 31, № 9. — С. 1110—1111.
4. Кусень С. И., Стойка Р. С. Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста. — М., 1985.
5. Ланкин В. В., Гуревич С. М. // Докл. АН СССР. — 1976. — Т. 37, № 3. — С. 705—708.
6. Метелица Д. И., Савенкова М. И., Курченко В. П. // Приклад. биохим. — 1987. — № 1. — С. 116—124.
7. Мишин В. М., Ляхович В. В. // Множественные формы цитохрома P-450. — Новосибирск, 1985. — С. 41—56.
8. Моин В. М. // Лаб. дело. — 1986. — № 12. — С. 724—727.
9. Саундерс Б. К. // Неорганическая биохимия. — М., 1978. — С. 434—464.
10. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. — М., 1977. — С. 49—62.
11. Цырлов И. Б. // Успехи соврем. биол. — 1988. — Т. 106, № 1. — С. 85—100.
12. Beuther E. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 241. — P. 8240—8251.
13. Habig W. H., Pabst M. I., Jacoby W. B. // Ibid. — Vol. 240, N 22. — P. 7130—7139.
14. Hein D. W. // Biochim. biophys. Acta. — 1988. — Vol. 15, N 1. — P. 37—66.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
16. Misraah P., Fridovich I. // Arch. Biochem. — 1977. — Vol. 181. — P. 308—312.
17. Omura T., Sato R. // J. biol. Chem. — 1964. — Vol. 239. — P. 2370—2377.
18. Parkinson A., Safe S. // Biochem. Pharmacol. — 1982. — Vol. 31. — P. 1849—1859.

19. Pickett C. B., Ieler R. L., Morion L., Lu A. Y. H. // J. Biol. Chem.— 1981.— Vol. 256.— P. 8815—8820.
20. Prough R. A., Burke M. D., Mayer R. T. // Meth. Enzymol.— 1978.— Vol. 52.— P. 372—381.
21. Ryan D. E., Thomas P. E., Lervin W. // Molec. Pharmacol.— 1977.— Vol. 13.— P. 521—528.
22. Sedlak I., Lindsay R. H. // Analyt. Biochem.— 1968.— Vol. 25.— P. 192—205.
23. Yasukochi Y., Masters B. S. S. // J. Biol. Chem.— 1976.— Vol. 251.— P. 5337—5344.
24. Zachary I., Rozengurt E. // Cancer Surv.— 1985.— Vol. 4, N 4.— P. 729—764.

Поступила 01.03.91

EFFECTS OF CARCINOGENIC AMINOBIPHENYLS ON HEPATOCYTES DIFFERENTIATION

V. P. Kurchenko, I. Ismakhil, I. V. Pronskaya

Byelorussian State University, Minsk

Contribution of various hemoproteins to peroxidase oxidation of benzidine and its derivatives as well as effects of these substances on functional state of hepatocytes are discussed. Benzidine and its derivatives were shown to induce those forms of cytochrome P-450 which were involved in accelerated oxidation of the carcinogenic drugs studied as well as affected the glutathione transferase, NADPH-dependent glutathione reductase activities and the activity of antioxidation system enzymes. Increase in content of cytochrome P-450, glutathione-dependent enzymes and other effects specific for adult hepatocytes, which occurred in presence of aminobiphenyls, were accompanied by decrease in content of receptors to epidermal factor of growth regulating the hepatocytes proliferation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616-006-008.939.6

Н. П. Мазуренко, Е. А. Коган, Н. М. Сухова,
И. Б. Зборовская

СИНТЕЗ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОНКОБЕЛКОВ В ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ

НИИ канцерогенеза Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР, Москва, Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

За последнее десятилетие в геноме человека идентифицировано более 40 новых клеточных генов, получивших название протоонкогенов, в связи с тем что нарушение их структуры или нормальной экспрессии приводит к crucialным изменениям в регуляции клеточного деления и дифференцировки, возникновению и росту опухоли [1]. Значительные усилия исследователей сосредоточены на выявлении особенностей структуры и метаболизма их белков. Один из экспериментальных подходов состоит в изучении экспрессии онкобелков в нормальных и опухолевых клетках. Нами были получены новые антисыворотки к синтетическим пептидам ряда онкобелков — *src* [6], *sis* [5], *fos* [7], *myc* и др., что позволило оценить иммуногенность отдельных фрагментов молекулы, выявить родственные антигены, исследовать экспрессию онкобелков в различных культурах трансформированных и опухолевых клеток. Установлено, что полученные антисыворотки могут быть использованы не только в молекулярно-биологических, но и в иммуноморфологических исследованиях для определения активности онкогенов в тканях [3].

Имеются многочисленные сообщения об усиле-

нии экспрессии онкогенов *myc*, *gas*, *fos*, *erb B* и др. на уровне РНК в наиболее распространенных опухолях человека [2, 27—29], однако данные о белковых продуктах онкогенов в опухолях ограничены. Представлялось важным исследовать и сравнить экспрессию ряда онкобелков в опухолях человека различной локализации с целью выявления возможных корреляций между активацией онкогенов и гистогенезом, уровнем дифференцировки ткани, прогрессией и метастазированием опухоли.

Методика. Образцы опухолей и макроскопически неизмененных нормальных тканей того же органа (условно-нормальные ткани) сразу после удаления замораживали и хранили в жидком азоте. Для исследования онкобелков методом иммуноблоттинга замороженные препараты измельчали в микродисембраторе фирмы «В. Вауп» и растворяли в буфере RIPA (20 мМ трис-НСl pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1 % дезоксихолат натрия, 1 % Triton X-100, 0,1 % додецилсульфат натрия — SDS, 1 мМ аprotинин и 0,1 М ингибитор PMSF). Для разрушения ДНК белковые лизаты обрабатывали ультразвуком, центрифугировали на низкой скорости и супернатант (по 100 мкг белка) использовали для электрофоретического разделения белков в 10 или 12 % SDS-полнакриламидном геле.

Белки из геля электрофоретически переносили на нитроцеллюлозные фильтры и для определения продуктов онкогенов использовали следующие специфические антитела: овечьи анти-*v-myc* [12] в разведении 1:500, кроличьи анти-*c-myc*, полученные нами к фрагменту 57—68 онкобелка (синтезированному сотрудником Института биоорганической химии АН СССР В. В. Антоенко) в разведении 1:500, кроличьи анти-*c-fos* к синтетическому пептиду 6—15 (1:200) [7], кроличьи анти-*v-sis* к пептиду 201—210 [5] (1:150), мышинные моноклональные Mab 327 к белку *src* [6] (1:200), мышинные моноклональные Mab SCRF 3511 к пептиду 95—118 p21 Ha-*gas* (BCB NIH, США) в титре 1:100. В качестве вторичных использовали антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой, а продукты реакции с H₂O₂ тестировали с диметилбензидином или орто-4-хлорнафтолом.

Иммуногистохимическое определение онкобелков проводили непрямым иммунопероксидазным методом [11] с антисыворотками к продуктам *v-myc* [12], *c-fos* [7], *v-sis* [5], кроличьей антисывороткой TBR к белку *src* [4] и мышинными Рап-*gas* антителами («Cetus», США).

Результаты и обсуждение. Исследование экспрессии онкобелков проводили методом иммуноблоттинга в тканях операционных биопсий больных раком желудка (46 образцов), раком легкого (66), меланомами (24). В ряде случаев, помимо препаратов самой опухоли, удавалось получить макроскопически неизмененные участки ткани того же органа, а также метастазы в лимфоузлы (табл. 1). Кроме того, мы исследовали некоторые другие опухоли (лимфосаркому легкого, злокачественную инвазивную), а также ткань метастазов от больных с различными формами сарком (синовиальная саркома, фиброзная гистиоцитома; хемодектома) и рака (рак яичников, плоскоклеточный рак кожи, гортани и языка). Наряду с этим были исследованы препараты некоторых доброкачественных опухолей (фиброма легкого, узловатый зоб, экринная порома) и неопухолевых заболеваний (туберкулома легкого, псевдоопухоль желудка, хроническое воспаление).

Синтез белкового продукта гена *c-myc* в препаратах тканей исследовали с антителами к фрагменту 3 экзона вирусного онкобелка *v-myc* [12]. Эти антитела практически во всех тестированных опухолевых препаратах и метастазах выявляли мощную экспрессию белков с мол. м. 64—66 кДа, а также более слабую полосу белка — 60 кДа

Экспрессия онкобелков в тканях различных опухолей

Объект исследования	Ткань	Онкобелок				
		myc	fos	ras	src	sis
Карцинома желудка	Первичная опухоль	22/22 (100)	22/22 (100)	11/19 (58)	3/22 (13)	—
	Метастаз	5/5	3/3	2/4	0/5	—
Карцинома легкого	Нормальная	13/13	11/14	12/15	1/13	—
	Первичная	34/37 (92)	12/12 (100)	17/17 (100)	20/33 (60)	9/16 (56)
	Метастаз	4/5	—	2/2	2/3	1/1
Меланома	Нормальная	21/24	3/6	5/6	5/24	1/2
	Первичная	6/6	5/6	0/3	0/4	1/3
Саркомы	Метастаз	18/18	18/18	14/15	1/15	9/12
	Первичная	2/2	2/2	2/2	0/2	—
Саркомы	Метастаз	5/5	3/3	3/4	1/5	1/3
Карцинома	Метастаз	4/6	6/6	1/6	0/5	3/4
Доброкачественные опухоли		2/3	2/3	2/3	0/3	—
Неопухолевые заболевания		2/3	2/3	1/3	0/3	—

Примечание. Здесь и в табл. 2: в числителе — положительные случаи, в знаменателе — количество тестируемых опухолей, в скобках — процент.

(рис. 1, а). Кроме того, продукция онкобелка c-myc наблюдалась в большинстве исследованных условно-нормальных тканей желудка и легких (см. табл. 1). Экспрессия белка c-myc обнаружена также в препаратах некоторых доброкачественных опухолей (узловатый зоб, псевдокарцинома желудка), однако не найдена при фиброме и туберкуломе легких. Продукт гена c-myc выявлен в опухолях и при использовании антител к синтетическому пептиду, соответствующему фрагменту 57--68 онкобелка c-myc. В нескольких случаях антитела к белку v-myc выявляли белок с мол. м. 34--37 кДа (см. рис. 1, а). Мы полагаем, что в данном случае удалось выявить короткую форму онкобелка — продукта гена L-myc, обнаруженную при трансляции *in vitro* короткой мРНК L-myc [16]. Этот белок наблюдался в препаратах нормальной и опухолевой ткани от большого аденокарциномой желудка (см. рис. 1, а), а также в препарате мелкоклеточного рака легкого (данные не приведены).

Полученные результаты подтверждают сообщения, что экспрессия гена myc характеризует высокую степень пролиферации клеток в опухолевой ткани. В то же время экспрессия онкобелка myc наблюдалась в большом проценте условно-нормальных тканей, т. е. визуально морфологически нормальных участков органов, пораженных опухолью. Это, с одной стороны, может иметь место за счет присутствия в этих тканях опухолевых клеток с высокой пролиферативной активностью, а с другой стороны, указывать на то, что и для нормальной ткани, окружающей опухоль, также характерна высокая степень пролиферации. Более определенный ответ мог быть получен только в иммуноморфологических исследованиях, так как взятый для молекулярно-биологического анализа препарат не всегда гистологически однороден.

При иммуногистохимическом исследовании рака легкого белковый продукт c-myc обнаружен в виде гранул и аморфного материала в ядрах и цитоплазме опухолевых клеток в препаратах различных гистологических типов (рис. 2, а). Экспрессия наблюдалась в 95 % опухолей и не выявлена в нормальных эпителиальных клетках (табл. 2). Небольшая экспрессия обнаружена в строме рака

легкого в очагах десмопластической реакции — пролиферирующих фибробластах, миофибробластах. В очагах регенерации эпителия, метоплазии и аденоматоза экспрессия выявлена в 29,7 % случаев, в основном в очагах пролиферации с атипией клеток, а уровень экспрессии в среднем был значительно ниже, чем при раке легкого [3].

Таким образом, высокий уровень экспрессии продукта гена c-myc в опухолях человека отражает высокий уровень пролиферации клеток и может быть связан с прогрессией опухоли.

Данных об экспрессии гена c-fos в опухолях человека на уровне РНК исключительно мало [2, 27--29], а экспрессию белка практически никто не исследовал. С помощью антител к синтетическому пептиду 6--15 белка c-fos выявлено присутствие продукта с мол. м. 62 кДа в подавляющем большинстве опухолей (см. табл. 1), однако уровень экспрессии варьировал в различных тканях. При раке желудка высокий уровень экспрессии регистрировался в 60 % опухолей. В ряде случаев удалось сравнить экспрессию c-fos в препаратах опухоли, условно-нормальной ткани и метастаза рака желудка от одного больного, обычно уровень экспрессии в опухоли и метастазе выше, чем в прилегающей к опухоли ткани (рис. 1, б). В меланомах и ее метастазах, а также в метастазах плоскоклеточного рака уровень экспрессии был относительно низким.

Увеличение синтеза белка pp62^{c-fos} обнаружено методом иммуноблоттинга также в 100 % препаратов рака легких. При иммуноморфологическом исследовании опухолей легких, белок c-fos обнаружен в ядрах клеток паренхимы, часто под

Таблица 2

Экспрессия онкобелков в легочной ткани в норме и патологии по данным иммуногистохимии

Онкобелок	Рак легкого	Регенераторные и предраковые изменения	Неизмененная легочная ткань
myc	18/19 (94,7)	11/37 (29,7)	0/44 (100)
fos	33/33 (100)	26/43 (60,5)	0/44 (100)
ras	25/33 (75,8)	17/42 (40,5)	0/44 (100)
src	19/30 (63,3)	14/42 (33,3)	0/44 (100)
sis	27/32 (84,4)	9/42 (21,4)	0/44 (100)

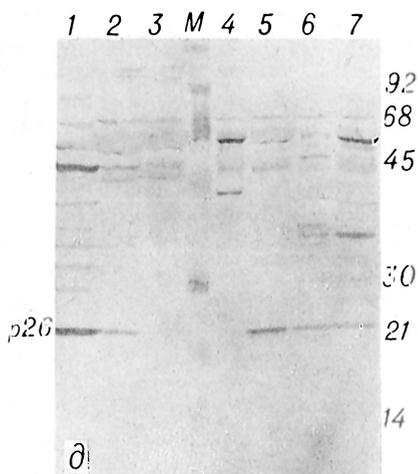
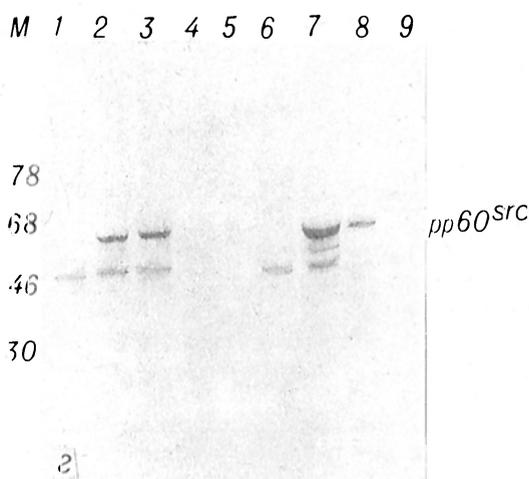
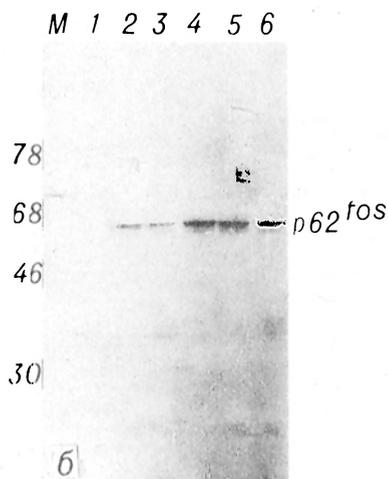
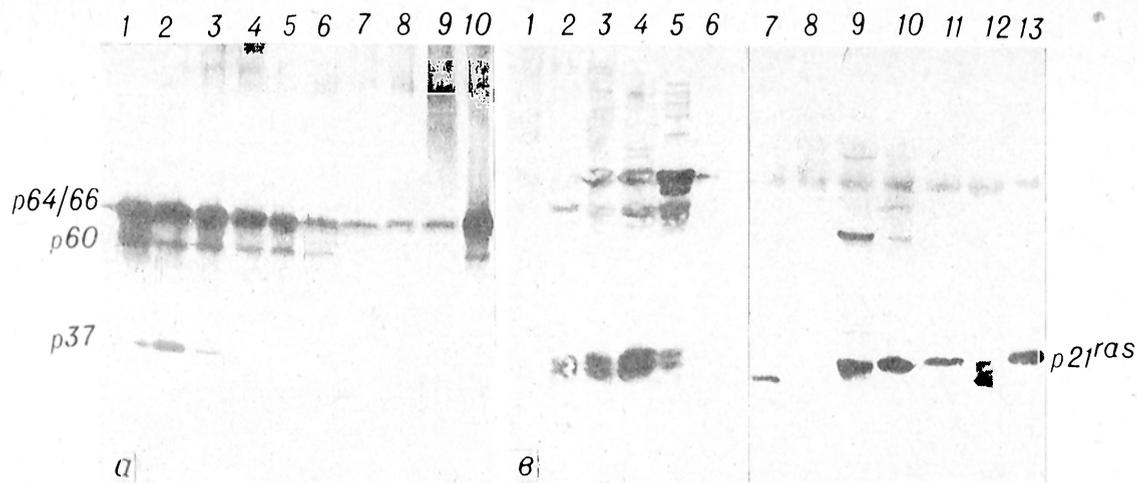


Рис. 1. Иммуноблоттинг лизатов опухолей с антителами к продуктам генов *myc* (а), *fos* (б), *ras* (в), *src* (г) и *sis* (д).

а: 1, 3, 4 — лизаты карциномы желудка, 2, 5 — условно-нормальная ткань желудка, 6–10 — карцинома легкого; б: 2, 4, 6 — карцинома желудка, 1, 3 — условно-нормальная ткань желудка, 5 — метастаз рака желудка в лимфоузле; в: 1, 4, 6 — карцинома желудка, 2, 5 — условно-нормальная ткань желудка, 3 — метастаз в лимфоузле; г: 1 — метастаз рака легкого в лимфоузле, 2, 3, 7, 8 — рак легкого, 6 — условно-нормальная ткань легкого, 5 — лимфосаркома; д: 1, 2 — метастазы меланомы в лимфоузлы, 3–5 — первичная меланома, 6, 7 — рак легкого.

кариолеммой в виде гранулярного или аморфного материала (см. рис. 2, б). Высокая экспрессия отмечена в опухолях с железистой дифференцировкой — бронхиолоальвеолярном раке, аденокарциноме и железисто-плоскоклеточном раке, а в мелкоклеточном раке чаще имеется относительно более слабая продукция белка *c-fos*. Продукт выделяется в небольших количествах и в неопухоловой ткани — альвеолярных макрофагах и клетках соединительной ткани. В очагах регенерации, метаплазии, дисплазии и аденоматоза экспрессия обнаружена в 60,5 % случаев (см. табл. 2). Высокая

экспрессия онкобелка коррелирует с высоким уровнем дифференцировки рака, а также более ранними этапами опухолевой прогрессии. По-видимому, *c-fos* активируется на ранних этапах канцерогенеза. Об этом также свидетельствует тот факт, что усиление экспрессии регистрируется уже на стадии предраковых изменений эпителия (в очагах пролиферации с атипией клеток), в то время как в очагах регенерации эпителия и в неизмененной легочной ткани экспрессия низкая или вовсе отсутствует [3].

Синтез белкового продукта *ras* исследовали с

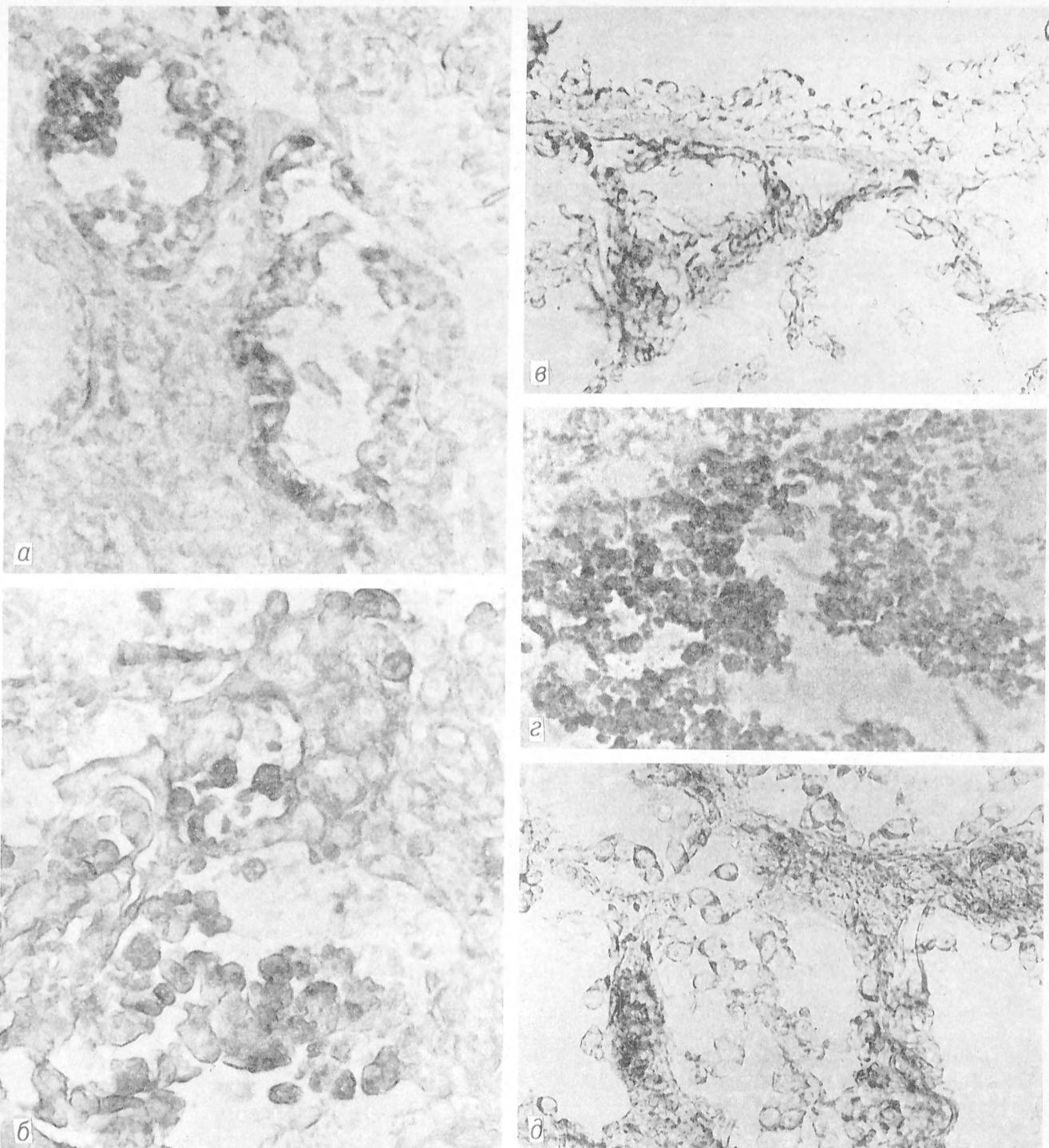


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление онкобелков в разных типах рака легкого.

а — белок *c-myc* в ядрах клеток высокодифференцированной аденокарциномы. $\times 400$; *б* — белок *c-fos* в ядрах и цитоплазме клеток высокодифференцированного плоскоклеточного рака. $\times 400$; *в* — белок *c-gas* в цитоплазме клеток бронхиоальвеолярного рака. $\times 200$; *г* — белок *c-src* в цитоплазме клеток мелкоклеточного рака с эндокринной дифференцировкой клеток. $\times 400$; *д* — белок *c-sis* в цитоплазме и ядрышках клеток бронхиоальвеолярного рака. $\times 250$.

помощью мышиных моноклональных антител к пептиду, соответствующему аминокислотам 96—118 белка p21 *c-Ha-gas*. Этот участок консервативен, и антитела выявляют также продукты генов *c-Ki-gas* и *N-gas*. Продукция онкобелка с мол. м. 21 кДа была выявлена в большинстве исследуемых опухолевых препаратов (см. табл. 1), что подтверждает представление о гене *gas* как о часто экспрессируемом в опухолях [2, 28, 29].

Онкобелки с мол. м. 21—23 кДа были найдены в 58 % препаратов рака желудка и почти всег-

да в прилегающей условно-нормальной ткани. В ряде случаев онкобелок экспрессировался в условно-нормальной ткани, но при этом не обнаруживался в опухолевой ткани того же больного (рис. 1, *в*). Полученные данные могут указывать на то, что онкоген *gas* в раке желудка активируется на ранних этапах канцерогенеза и его постоянная экспрессия не является необходимой для поддержания трансформации. Это подтверждается сообщением о более частой транскрипции гена *gas* на ранних стадиях развития опухоли в

дисплазиях и метаплазиях (57–63%), чем в первичном раке желудка (38%) [14, 15]. В то же время экспрессия белка *gas* значительно уменьшена в метастазах рака желудка по сравнению с первичными опухолями [17]. Экспрессию белка *gas* в прилегающих к опухоли нормальных тканях также наблюдали ранее при анализе рака желудка [14, 25] и кишечника [18]. Таким образом, наблюдается негативная корреляция между экспрессией гена *gas* и развитием рака желудка и, следовательно, отсутствие онкобелка *gas* в препаратах удаленных опухолей может свидетельствовать о запущенности процесса, поздно проведенной операции и плохом прогнозе для больного.

Однако при исследовании меланом мы обнаружили совсем другую картину. В 14 из 15 случаев (95%) метастазов меланом обнаруживался продукт гена *gas*, но он не выявлен в 3 случаях первичных меланом (см. рис. 1). С большой осторожностью можно предположить, что регистрируемое усиление продукции белка *gas* характерно для метастазирующих клонов клеток меланомы, появляющихся в ходе опухолевой прогрессии. К выводу об усилении экспрессии гена *gas* с прогрессией опухоли пришли и другие исследователи, обнаружившие активацию гена *gas* в культурах клеток инвазивных, но не ранних первичных меланом [9]. Интересно, что в 3 из 14 случаев (21%) метастазов меланомы мы наблюдали онкобелок с более высокой подвижностью, которая может соответствовать продукту гена *N-gas*. Характерно, что этот ген активирован в 20% культур клеток меланом [30].

Экспрессия гена *gas* методом иммуноблоттинга выявлена также в большинстве препаратов рака легкого и прилегающих условно-нормальных тканей (см. табл. 1). При иммуногистохимическом исследовании опухолей легкого продукт *gas* обнаруживался на внутренней стороне цитоплазматической мембраны (рис. 2, в) в 75,8% случаев, и уровень экспрессии колебался в широких пределах. Наиболее низкий уровень экспрессии выявлен в мелкоклеточном раке легкого, причем отмечена тенденция к усилению синтеза белка при увеличении размеров опухоли и появлении метастазов. В аденокарциномах легкого экспрессия белка *gas* чаще выявлялась на ранних стадиях прогрессии и не была связана с метастазированием [3]. В очагах регенерации эпителия, метаплазии, дисплазии и аденоматоза экспрессия *gas* обнаружена в 40,5% случаев, как правило, на более низком уровне, чем в раке легкого (см. табл. 2). В отдельных случаях высокая экспрессия *gas* наблюдалась на стадии предрака в очагах аденоматоза.

В отличие от генов *myc*, *fos*, *gas* онкоген *src*, судя по уровню мРНК, относится к числу «молчащих» в опухолях человека [2, 28, 29]. Показано, что экспрессия белка *src* характерна для нейронов [13], клеток нейроретины и отсутствует в большинстве нормальных тканей человека. Обнаружено увеличение ферментативной активности белка *src* в нейробластомах [26], саркомах, карциномах молочной железы [21] и толстой кишки [10], а также в культуре клеток мелкоклеточного рака легкого с нейроэндокринной дифференцировкой клеток [24].

Анализ синтеза продукта гена *src* в различных

опухолях человека проводили иммуноблоттингом с моноклональными антителами Mab 327 [23]. Действительно, в большинстве исследованных опухолевых препаратов и нормальных тканях белок *src* не выявлен (см. табл. 1). При исследовании опухоли желудка очень слабая экспрессия обнаружена в 3 из 22 препаратов, из них в одном случае экспрессия наблюдалась как в препарате опухоли, так и в еще больших количествах в условно-нормальной ткани того же больного (рис. 1, а). В целом для рака желудка активация гена *src* нехарактерна; не исключено, что положительный результат наблюдается в опухолях, содержащих атипичные клетки, характерные для рака кишечника, который отличается высокой экспрессией гена *src* [10]. Онкобелок также не обнаружен в меланоме, как в первичных, так и в метастазах меланом в лимфоузлы, а также в других опухолях (злокачественная шваннома, синовиальная саркома, хемодектома и др.) и метастазах (рака горла, кожи, гортани, аденокарциномы яичников). Экспрессия белка *src* отсутствовала в доброкачественных опухолях (фиброма легкого, экринная порома, узловатый зуб), а также при неопухолевых заболеваниях (туберкулома и псевдоопухоль желудка) (см. табл. 1).

В то же время онкобелок *pp60^{c-src}* обнаружен в 20 из 33 препаратов рака легкого и в 2 из 3 исследованных метастазов в лимфоузлы, т. е. в 60% случаев (см. табл. 1 и 2). Сопоставление данных иммуноблоттинга и морфологических характеристик опухолей показало, что синтез белка *src* имеет место в опухолях различных гистогенетических типов: как в мелкоклеточном раке легкого, имеющем нейроэндокринное происхождение, так и в различных формах немелкоклеточного рака легкого (80% аденокарцином и бронхиолоальвеолярного рака, железисто-плоскоклеточный рак и в 50% плоскоклеточного рака легкого). Установлено также, что в группе плоскоклеточного рака частота экспрессии онкобелка коррелирует с более низким уровнем дифференцировки опухоли [3, 8].

При иммуногистохимическом исследовании рака легкого с сывороткой TBR продукт гена *src* располагался в цитоплазме клеток вблизи наружной мембраны (рис. 2, а) в 63% рака легкого и в 33,3% случаев регенерации эпителия, метаплазии, дисплазии и аденоматоза (см. табл. 2). В группе плоскоклеточного рака высокая экспрессия чаще встречалась среди низкодифференцированных опухолей, чем среди умеренно- и высокодифференцированных [3]. Таким образом, наблюдается корреляция в данных иммуноблоттинга и иммуногистохимии, проведенных с разными антителами к белку *src* и часто с разными препаратами опухолей легких.

Помимо рака легкого, нами обнаружен высокий уровень экспрессии белка *src* при раке шейки матки и полипозе толстого кишечника [8]. Общим предшественником эпителиальных тканей этих органов является эпителий первичной кишки и, возможно, активация гена *src* связана с развитием опухолевого процесса в этих тканях.

Ген *c-sis* человека кодирует белок с мол. м. 26 кДа, гомологичный В-цепи тромбоцитарного фактора роста PDGF [20]. Его транскрипт и белковый продукт обнаружены в культурах клеток и

первичных препаратах меланом, глиобластом, фибро- и остеосарком [19, 20, 27, 31] и не выявляются в нормальных тканях. мРНК *c-sis* также выявлена в 5 из 11 культур клеток немелкоклеточного рака легких [22].

Исследование белкового продукта гена *c-sis* проводили с помощью антител к пептиду, соответствующему аминокислотам 201—210 вирусного онкобелка р28^{sis} [5]. Экспрессия белка с мол. м. 26 кДа выявлена в 1 из 3 случаев первичных меланом, а также в большом количестве тестируемых метастазов меланомы в лимфоузлы (рис. 1, *д*). Методом иммуноблоттинга в опухолях легких этот белок обнаружен в 50 % случаев (см. табл. 1). При иммуноморфологическом исследовании опухолей легких белок *c-sis* обнаружен в цитоплазме клеток, а также в отдельных случаях и в ядрышках (рис. 2, *д*). Экспрессия наблюдалась в 84 % случаев рака легкого, в небольшом проценте случаев в строме опухолей, эндотелии новообразованных сосудов и в альвеолярных макрофагах. В очагах регенерации эпителия, метаплазии, дисплазии и аденоматоза онкобелок обнаружен в 21 % случаев (см. табл. 2). Таким образом, продукт гена *c-sis* достаточно часто встречается в опухолях и, по-видимому, играет важную роль в пролиферации опухолевых клеток определенных гистологических типов. Кроме того, экспрессия белка *c-sis* характерна для эндотелиальных клеток [19] и в связи с васкуляризацией опухолей в них усилен аутокринный синтез этого белка.

Полученные данные свидетельствуют об увеличении синтеза продуктов онкогенов в опухолях по сравнению с нормальными тканями. Экспрессия онкобелков наблюдается при иммуноморфологическом исследовании уже на стадии предрака, однако на более низком уровне и в меньшем проценте случаев, чем в опухолях. Складывается впечатление, что экспрессия некоторых онкогенов (*myc*, *fos*) не связана с гистологическим типом ткани, хотя уровень экспрессии в опухолях различных органов варьирует. В то же время экспрессия других онкогенов (*src*, *sis*) имеет определенную зависимость от гистогенеза опухоли. В частности, экспрессия белка *src* характерна для нервных клеток и, по-видимому, для опухолевых тканей происходящих из эндотелия первичной кишки. Канцерогенез является многостадийным процессом, и участие онкогенов в отдельных его этапах изучено недостаточно. Можно думать, что одни онкобелки (*fos*, *ras*) активны преимущественно на ранних этапах, а другие (*myc*, *sis*, *src*) важны для прогрессии опухоли. Некоторые онкобелки могут синтезироваться в разных опухолях на разных этапах канцерогенеза. Так, *ras*, по-видимому, активируется на ранних стадиях в раке желудка и аденокарциноме легкого и на более поздних — в меланомах и мелкоклеточном раке легкого. До сих пор трудно сказать, в каких случаях наблюдаемые изменения активности онкогена являются причиной процесса, а в каких — следствием его. В последнем случае экспрессия онкобелка *ras*, возможно, является следствием уже развивающегося процесса трансформации. Хотя механизмы возникновения и поддержания трансформированного состояния многообразны, по-видимому, все же в опухолях одного гистогенеза, находящихся на одном и том же уровне дифференцировки и стадии опухолевой прогрессии, чаще всего активируются опреде-

ленные онкогены. В связи с этим представляется важным дальнейшее изучение синтеза и распространения белковых продуктов онкогенов в различных опухолях человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселев Ф. Л., Павлиш О. А., Татосян А. Г. // Молекулярные механизмы канцерогенеза у человека. — М., 1990. — С. 31—33.
2. Киселев Ф. Л., Спитковский Д. Д. // Журн. ВМО. — 1986. — Т. 31, № 3. — С. 272—277.
3. Коган Е. А., Мазуренко Н. Н., Юшков П. В. и др. // Арх. пат. — 1990. — № 8. — С. 3—11.
4. Мазуренко Н. Н., Федоров С. Н., Боговский Б. П. и др. // Экспер. онкол. — 1986. — № 8. — С. 18—21.
5. Мазуренко Н. Н., Гладкова Т. И., Михалева И. И. и др. // Молекул. биол. — 1987. — № 4. — С. 972—980.
6. Мазуренко Н. Н., Тищенко В. А., Виноградов В. А., Киселев Ф. Л. // Там же. — 1988. — № 6. — С. 844—852.
7. Мазуренко Н. Н., Киселева Н. П., Кудрявец Ю. И. и др. // Там же. — 1990. — № 5. — С. 1351—1362.
8. Мазуренко Н. Н., Зборовская И. Б., Нестерова И. И. и др. // Докл. АН СССР. — 1991. — Т. 316, № 5. — С. 4826—4831.
9. Albino A. P., Nanus D. M., Menlle I. R. et al. // *Oncogene*. — 1989. — Vol. 4. — P. 1363—1374.
10. Bolen J. B., Veillette A., Schwartz A. M. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA*. — 1987. — Vol. 84. — P. 2251—2255.
11. Boume J. A. // *Handbook of Immunoperoxidase Staining Method*. — Santa Barbara, 1983. — P. 35.
12. Bunte T., Donner P., P[af] E. et al. // *EMBO. J.* — 1984. — Vol. 3. — P. 1919—1924.
13. Colton P. C., Brugge J. S. // *Molec. Cell. Biol.* — 1983. — Vol. 3. — P. 1157—1162.
14. Czerniak B., Herz F., Koss L., Schlom J. // *Cancer (Phylad.)*. — 1987. — Vol. 60. — P. 2432—2436.
15. Czerniak B., Herz F., Gorczyca W., Koss L. // *Ibid.* — 1989. — P. 1467—1473.
16. De Greve J., Batley J., Fedorko J. et al. // *Molec. Cell Biol.* — 1988. — Vol. 8. — P. 4281—4388.
17. Gallick G. E., Kurzrock R., Kloetzer W. S. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA*. — 1985. — Vol. 82. — P. 1795—1799.
18. Hand P. H., Vilasi V., Thor A. et al. // *J. nat. Cancer Inst.* — 1987. — Vol. 79. — P. 59—65.
19. Hermansson M., Nister M., Betsholtz C. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA*. — 1988. — Vol. 85. — P. 7748—7752.
20. Igarashi H., Rao C. D., Siroff M. et al. // *Oncogene*. — 1987. — Vol. 1. — P. 79—85.
21. Jacobs C., Rubsamen H. // *Cancer Res.* — 1983. — Vol. 43. — P. 1696—1702.
22. Kiefer P. E., Wegmann B., Bacher M. et al. // *J. Cancer Res. clin. Oncol.* — 1990. — Vol. 116. — P. 29—37.
23. Lapsich L., Lewis A. J., Brugge J. S. // *J. Virol.* — 1983. — Vol. 48. — P. 352—360.
24. Mellstrom K., Bjelam C., Hammerling U., Pahlman S. // *Molec. Cell Biol.* — 1987. — Vol. 7. — P. 4178—4184.
25. Nakajima K., Kuzumaki N., Oda A. et al. // *Oncology*. — 1989. — Vol. 46. — P. 260—265.
26. O'Shaghnessy J., Desean V., Amini S. et al. // *Oncogene Res.* — 1987. — Vol. 2. — P. 1—18.
27. Shin D., Gupta V., Donner L. et al. // *Anticancer Res.* — 1987. — Vol. 7. — P. 1117—1124.
28. Slamon D. J., de Kernion J. B., Verma J. M. et al. // *Science*. — 1984. — Vol. 224. — P. 236—262.
29. Tatosyan A. G., Galetsky S. A., Kissel'jova N. P. et al. // *Int. J. Cancer*. — 1985. — Vol. 35. — P. 731—736.
30. Van't Veer L. J., Burgering B. M. T., Vertlug R. et al. // *Molec. Cell Biol.* — 1989. — Vol. 9. — P. 3114—3116.
31. Westermark B., Johnsson A., Paulsson Y. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA*. — 1986. — Vol. 83. — P. 7195—7200.

Получено 18.02.91

SYNTHESIS AND DISTRIBUTION OF ONCOPROTEINS IN TUMORAL TISSUES

N. N. Mazurenko, E. A. Kogan, N. M. Sukhova, I. B. Zborovskaya

Institute of Carcinogenesis, All-Union Oncological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, I. M. Sechenov Medical Academy, Moscow

Expression of *myc*, *fos*, *src*, *ras* and *sis* oncoproteins was

studied in biopsy material of tumors, metastases and "normal" surrounding tissues from patients with different histological types of stomach and lung cancer, melanoma and other malignancy using immunoblotting. Besides, the immunohistochemical distribution of these oncoproteins under lung cancer and precancer conditions was analysed. The oncoproteins expression was significantly higher in cancer as compared with precancer and "normal" surrounding tissues. C-myc and c-fos gene products were detected in all the malignant tissues irrespectively to histogenesis of tumors, while the level of c-myc expression was rather high. The high level of c-fos expression was observed in stomach carcinomas and at early stages of lung tumor progression. C-src and c-sis genes expression varied in tumors of different histogenesis. C-src proteins were found in 60% of lung cancer but it was practically absent in stomach carcinomas and in melanomas. C-sis gene product was observed in some melanomas and lung carcinomas. Ras gene can be activated at early stages of tumor progression of stomach carcinomas and lung adenocarcinomas and at later stages of tumor progression in melanomas and small-cell lung carcinomas. Thus, there are some correlations between oncoprotein expression and tumor tissue histogenesis and progression.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 615.356:1577.161.1/3+577.164.21.015.4:616-006].076.9

Т. С. Морозкина, В. Н. Суколинский,
А. В. Стрельников

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ВИТАМИНОВ Е, А, С НА АНТИОКСИДАНТНУЮ ЗАЩИТУ ОПУХОЛЕВЫХ И НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

НИИ онкологии Минздрава БССР, Минск, Минский медицинский институт

Усиление процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) в организме опухоленосителя общепризнано, и применение антиоксидантов (АО) в комплексной терапии рака представляется обоснованным. Однако возникает опасение, что введенные АО будут захватываться опухолью, способствуя повышению ее резистентности к химиотерапевтическому и лучевому воздействию. На основании изучения особенностей метаболизма злокачественных и нормальных тканей предложен антиоксидантный комплекс (АОК) витаминов, способный избирательно усиливать антиоксидантную защиту не пораженных опухолью тканей.

Методика. Опыты проведены на белых беспородных крысах массой 150–180 г. Контрольной группе животных однократно подкожно за 1, 4 и 24 ч до забоя (изолированно и в сочетании друг с другом) вводили витамины: аскорбиновую кислоту (АК) — 0,2–0,3 мг/г, токоферола ацетат (ТФ) — 0,08–0,09 мг/г и ретинола ацетат — 0,001–0,002 мг/г. 229 подопытным крысам подкожно имплантировали взвесь клеток саркомы 45. Начиная с 7-х суток после перевивки ежедневно в течение 5–7 дней вводили АОК; на 13–15-е сутки крыс декапитировали (период интенсивного роста опухоли). 20 мышам линии С57bl/bJG перевивали лейкоз L₁, половине из них назначали АОК (3 раза через сутки; первое введение осуществляли на следующие сутки после перевивки), животных декапитировали на 6–7-е сутки (терминальный период).

В крови и органах животных определяли активность глутатионредуктазы [21], супероксиддисмутазы [14], содержание восстановленного глутатиона [18], малонового диальдегида (МДА) [19], диеновых конъюгатов [7], АК, дегидроаскорбиновой (ДАК) и дикетоглулоновой (ДКГК) кислот [13], ТФ и убихинона [20]; исследовали дыхательную функцию митохондрий [16].

Результаты и обсуждение. У крыс с саркомой 45 содержание конечных продуктов ПОЛ увеличено в митохондриях печени и плазме крови [9]. Стимуляция процесса ПОЛ объясняется мобилизацией распада липидов (опухоль — «ловушка» глюкозы в организме [15]) и тканевой гипоксией. Лучевая терапия усугубляет свободно-радикальное повреждение тканей [1]. Так, после тотального γ -облучения (10 Гр) животных-опухоленосителей содержание МДА в гомогенате печени значительно возрастает: с $19,3 \pm 1,83$ до $27,0 \pm 2,3$ нмоль/г ($p < 0,05$; в норме $13,6 \pm 0,57$ нмоль/г). В самих злокачественных опухолях ПОЛ менее интенсивно, что объясняется эффективностью их ферментативной и неферментативной антиоксидантной защиты [17]. Действительно, содержание важнейшего биоАО — ТФ — в саркоме 45 выше, чем в органах крыс-опухоленосителей (рис. 1).

В организме по мере развития злокачественного процесса уровень АО падает [11]. Это объясняется, с одной стороны, усилением расхода АО на предотвращение интенсификации ПОЛ в тканях опухолевого организма, с другой — способностью опухоли накапливать АО. По нашему мнению, дефицит АО должен компенсироваться введением их извне не только с целью предотвращения стимуляции свободно-радикальных процессов (особенно при лучевой терапии), но и для борьбы с развивающимся гиповитаминозом Е, А и С — витаминов антиоксидантного действия. Применение АО в комплексном лечении рака необходимо также для метаболической реабилитации больных, снижения токсического действия на организм химио- и лучевой терапии [12].

Однако необходимость антиоксидантной защиты ставится под сомнение из-за возможности избирательного поглощения АО злокачественной опухолью. Кроме того, витамины-АО плохо усваи-

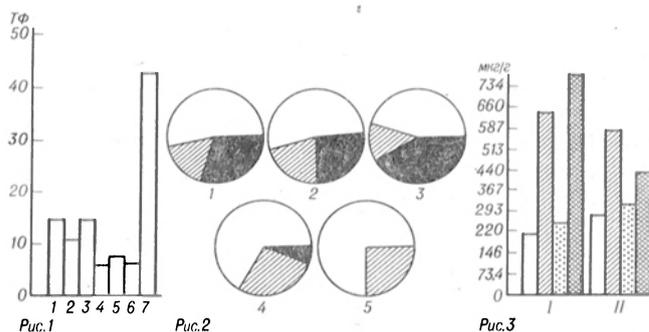


Рис. 1. Содержание ТФ (в мкг/г) в саркоме 45 и органах крыс-опухоленосителей.

1 — печень; 2 — легкие; 3 — скелетные мышцы; 4 — селезенка; 5 — жир; 6 — плазма крови; 7 — саркома.

Рис. 2. Относительное содержание (в %) АК, ДАК и ДКГК в печени и саркоме 45 до и после введения АОК.

1 — норма; 2 — печень опухоленосителя; 3 — печень опухоленосителя после введения АОК (увеличение содержания ДКГК); 4 — саркома 45; 5 — саркома 45 после введения АОК (отсутствие ДКГК). Светлые секторы — АК; заштрихованные секторы — ДАК; темные сектора — ДКГК.

Рис. 3. Содержание убихинона (в мкг/г) в печени и селезенке в норме и при развитии лейкоза до и после введения АОК.

1 — печень; II — селезенка. Светлые столбики — норма; столбики с вертикальной штриховкой — норма + АОК; столбики с точками — лейкоз; столбики с двойной штриховкой — лейкоз + АОК.

ваются организмом. Например, смягчение метаболического ацидоза и нормализация уровня АК в крови онкологических больных достигаются лишь назначением 2 г/сут АК [3]. Особые трудности при проведении лучевой терапии возникают в связи с низкой эффективностью радиозащитного действия известных биоАО, в частности ТФ.

Каким же образом повысить степень избирательности антиоксидантной защиты нормальных тканей, что особенно важно при проведении лучевой терапии? Для решения этой задачи необходимо учитывать биологические особенности злокачественных клеток.

Опухоль характеризуется анаэробным типом метаболизма (способностью поддерживать жизнедеятельность за счет активированного гликолиза), слабым дыханием *in vivo*, что обусловлено гипоксическим состоянием опухоли. Жадно поглощая глюкозу, она почти не способна утилизировать субстраты цикла Кребса — основные субстраты тканевого дыхания. Митохондрии в злокачественных клетках изменены, обладают слабой фосфорилирующей активностью [11]. Напротив, подавляющее большинство тканей организма характеризуется аэробным типом метаболизма, т. е. основная масса энергии клеток производится митохондриями. Логично предположить, что меры корригирующего воздействия, направленные на стабилизацию структуры и функции митохондрий, должны улучшить энергетический обмен нормальных, но не опухолевых тканей. Это тем более важно, что митохондрии тканей опухоленосителя характеризуются частичным разобщением окислительного фосфорилирования [11] и перевод их в оптимально энергезированное состояние будет обеспечивать устойчивость организма к стрессу [6]. Следовательно, воздействия, направленные на восстановление энергетической функции митохондрий тканей опухоленосителя, должны не только улучшить энергетический метаболизм этих тканей, но и одновременно повысить устойчивость их к радиационному повреждению. Отметим и важный факт существования четкой корреляционной зависимости между радиочувствительностью тканей и числом митохондрий в них [16].

Стабилизаторами процесса свободнорадикального окисления, интенсифицируемого при облучении, в митохондриях служат АО ТФ и убихинон. ТФ — необходимый участник в реакциях синтеза убихинона [4]; по-видимому, последний является основным АО митохондрий, так как его содержание в них по крайней мере на порядок выше. При лучевой патологии резистентность животных к радиации возрастает с увеличением содержания убихинона [5]. Этими данными, вероятно, и можно объяснить высокую устойчивость к облучению клеток, содержащих много митохондрий. Учитывая изложенное, введение ТФ должно оказывать радиозащитное действие. Однако его применение оказалось малоэффективным.

По нашему мнению, при поисках средств антиоксидантной защиты часто не учитывается тот факт, что процессы свободнорадикального окисления протекают не только в мембранах, но и в водной фазе клетки. Следовательно, именно сочетанное применение водо- и липидо-

растворимых АО должно оказать радиозащитное действие.

Из водорастворимых АО наибольший интерес представляет АК, так как АК экономит фонд витамина Е (в силу ее способности регенерировать радикал ТФ, образующийся в реакциях ПОЛ); применение АК необходимо для устранения гиповитаминоза С; АК плохо утилизируется либо не усваивается вовсе злокачественной опухолью, о чем свидетельствует низкий (часто равный нулю) уровень в ней ДКГК (рис. 2). Однако явления гиповитаминоза С способны устранять лишь высокие дозы АК, в которых она может оказать прооксидантное действие.

Для предупреждения прооксидантного эффекта АК (обезвреживание радикала моноДАК, радикалов жирных кислот в реакциях Fe^{2+} — НАДФХ × Н-аскорбатстимулируемого ПОЛ) мы использовали токоферол. ТФ нетоксичен даже в больших дозах. Он не только гасит свободные радикалы липидов, реагирует с их перекисями и активными формами кислорода, но и улучшает дыхательную функцию митохондрий. Явления недостаточности ТФ (снижение антиоксидантной активности липидов и осмотической резистентности эритроцитов, усиление ПОЛ, нарушение фосфорилирующей функции митохондрий и уменьшение содержания макроэргических соединений) постоянно отмечаются при росте злокачественных новообразований. Таким образом, ТФ и АК выступают как синергисты в антиоксидантной защите клеток.

ТФ предохраняет от окислительного распада ретинол, а последний в свою очередь необходим для реализации антиоксидантной активности ТФ в биомембранах, содержащих ТФ в концентрациях, явно недостаточных для его функционирования как АО. Витамин А является также синергистом АК (он способен тормозить F^{2+} — НАДФ · Н-аскорбатстимулируемое ПОЛ).

Нами впервые установлено [10], что изолированное применение этих витаминов существенно отличается от комплексного: если после введения ТФ скорость фосфорилирующего окисления в митохондриях печени не изменялось, а после введения АК снижалась, то под влиянием АОК она значительно возросла; после введения АК увеличилось содержание МДА в печени, после введения комплекса оно снизилось; ТФ не оказал влияния на уровень восстановленного глутатиона и активность глутатионредуктазы, в то время как под влиянием комплекса они возросли. Существенное различие эффекта, вызываемого раздельным и сочетанным применением витаминов Е, А и С, проявилось в их различной способности накапливаться и утилизироваться тканями. В связи с указанными свойствами комплекс этих витаминов назван антиоксидантным.

Существует обширная литература о противоопухолевой активности витаминов Е, А, С. По нашим данным [9], их сочетанное применение не стимулировало рост саркомы 45 или угнетало его, а введение их облученным животным-опухоленосителям усиливало антиоксидантную защиту нормальных тканей. Так, в печени крыс с саркомой 45 на 3-и сутки после тотального γ -облучения (14 Гр) содержание МДА увеличивалось на 41 % ($p < 0,05$) по сравнению с

исходным уровнем, на фоне введения АОК оно нормализовалось (снизилось до $13,2 \pm 0,88$ нмоль/г. у облученных $27,0 \pm 3,0$ нмоль/г; $p < 0,001$); активность супероксиддисмутазы эритроцитов при облучении опухоленосителей резко снижалась (с $2,44 \pm 0,44$ до $0,64 \pm 0,11$ ед. акт./г НВ. $p < 0,05$), на фоне введения АОК возросла до $3,53 \pm 0,75$ ед. акт./г НВ. Подчеркнем при этом, что антиоксидантная защита саркомы 45 не только не увеличилась, но даже снизилась (уровень МДА в ней возрос на 40 %; $p < 0,001$), что обусловлено скорее всего накоплением в опухоли ретинола (но не ТФ или убихинона). Интересно, что саркома в отличие от печени не способна дополнительно накапливать ТФ даже после многократного (в течение 5—7 сут) введения АОК; в ней не изменилось соотношение ТФ/убихинон (равное 2,4), в то время как в печени опухоленосителя это соотношение возросло в 7 раз ($p < 0,001$). Аналогичные результаты получены нами в отношении накопления и обмена АК. Если в печени после введения АОК содержание ДКГК значительно увеличилось, то в саркоме оно осталось равным нулю (см. рис. 2). Следовательно, после введения АОК улучшается использование витаминов Е и С тканями опухоленосителя, но не самой опухоли.

Об усилении избирательности антиоксидантной защиты нормальных тканей после введения АОК свидетельствуют, в частности, и опыты по определению содержания убихинона в печени и селезенке мышей с лейкозом: содержание убихинона возрастает лишь в непораженных злокачественным процессом органах (печени), в то время как в селезенке, содержащей лейкозные клетки, этого не происходит (рис. 3). Введение АОК способствовало нормализации и других показателей ферментативной и неферментативной антиоксидантной защиты тканей мышей с лейкозом [8]. Об отсутствии усиления антиоксидантной защиты раковых клеток человека при введении онкологическим больным витаминов Е, А, С свидетельствуют данные, опубликованные в литературе [3].

Убедительным доказательством того, что АОК не защищает раковые клетки, мы считаем результаты опытов с локальным облучением (20 Гр) трансплантируемых опухолей у животных, которым предварительно вводили (1-я группа) или не вводили (2-я группа) АОК. Удаление облученных опухолей и последующая их перевивка здоровым животным показали, что ни объем опухолей, ни продолжительность жизни животных обеих групп не различались: продолжительность жизни у крыс с саркомой 45 после перевивки облученных опухолей от животных, не получавших АОК, составила $68,9 \pm 2,12$ сут; у получавших — $65,7 \pm 1,85$ сут; с карциносаркомой Уокера — соответственно $24,5 \pm 2,12$ и $24,9 \pm 1,85$ сут; с асцитной карциномой Эрлиха — $29,9 \pm 2,65$ и $28,5 \pm 0,56$ сут.

Таким образом, применение витаминов Е, А, С в предложенных дозах и режиме введения изменяет биологическое действие входящих в его состав витаминов, в связи с чем АОК следует рассматривать как новый препарат с неизвестным ранее механизмом действия. АОК избирательно усиливает антиоксидантную защиту нормальных,

но не злокачественных тканей. Это свойство АОК может быть использовано при проведении химио- и лучевой терапии онкологическим больным с целью защиты нормальных тканей, попадающих в зону облучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабои В. А., Чебогарев Е. Е. // Радиобиология. — 1986. — № 5. — С. 591—597.
2. Галкина С. И. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 4. — С. 91—94.
3. Горожанская Э. Г., Свиридова С. П., Ларионова В. Б. // Всесоюзный симпозиум «Биохимия опухолевой клетки»: Тезисы. — М., 1990. — С. 35—36.
4. Донченко Г. В. Биохимия убихинона. — Киев, 1988.
5. Илюченко Т. Ю., Шадуцкий К. С., Самохвалов Г. И., Обольникова Е. А. // Фармакол. и токсикол. — 1983. — № 6. — С. 63—66.
6. Кондрашова М. П., Ананенко А. А. // Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. — М., 1973. — С. 106—129.
7. Костюк В. А., Потанович А. И., Лунец Е. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 4. — С. 125—127.
8. Кувшинников В. А., Морозкина Т. С., Свирновский А. И. и др. // Гематол. и трансфузиол. — 1989. — № 8. — С. 23—28.
9. Морозкина Т. С., Шкробнева И. И., Полякова З. И. и др. // Здравоохр. Белоруссии. — 1988. — № 8. — С. 39—42.
10. Морозкина Т. С., Гринько И. В., Суколинский В. П. и др. // Вопр. питания. — 1989. — № 3. — С. 56—60.
11. Морозкина Т. С. Энергетический обмен и питание при росте злокачественных новообразований. — Минск, 1989.
12. Суколинский В. П. // Вопр. онкол. — 1990. — № 3. — С. 13—144.
13. Соколовский В. В., Лебедева Л. В., Лизлун Г. В. // Лаб. дело. — 1974. — № 6. — С. 160—163.
14. Чушков В. П., Осинская Л. Ф. // Вопр. мед. химии. — 1977. — № 5. — С. 1161—1168.
15. Шапов В. С. Биохимические аспекты опухолевого роста. — М., 1975.
16. Эйдус М. Х. Неспецифические реакции клеток и радиочувствительность. — М., 1977.
17. Cheesman R., Burton G., Indold K., Slater T. // Toxicol. Path. — 1984. — Vol. 12. — P. 235—239.
18. Kay W., Murfit K. C. // Biochem. J. — 1960. — Vol. 74, N 1. — P. 203—208.
19. Placer C. A., Chesman L. L., Jonson B. C. // Analyt. Biochem. — 1966. — Vol. 16, N 2. — P. 359—364.
20. Taylor S. L. // Lipids. — 1976. — Vol. 11, N 7. — P. 350—358.
21. Wendell P. L. // Arch. Biochem. — 1967. — Vol. 136, N 2. — P. 402—403.

Поступила 10.03.91

SELECTIVE EFFECT OF VITAMINS E, A AND C COMPLEX ON THE ANTIOXIDATION SYSTEM IN NORMAL AND TUMORAL TISSUES

T. S. Morozhkina, V. N. Sukolinsky, A. V. Strel'nikov

Institute of Oncology, Ministry of Public Health of the Byelorussian SSR, Medical School, Minsk

An antioxidation complex of E, A and C vitamins was proposed which was able to amplify selectively the antioxidation activity in tumor-bearing tissues but not in malignant tumor itself.

Е. Ю. Москалева, И. Д. Гроздова

СОДЕРЖАНИЕ сАМР, АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНКИНАЗ И СТРУКТУРА ДНК В ПОКОЯЩИХСЯ И ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И В КЛЕТКАХ Т-ЛИМФОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Всесоюзный научный центр молекулярной диагностики и лечения Минздрава СССР, Москва

Стимуляция покоящихся клеток к пролиферации индуцирует в них последовательный каскад событий, в результате которых клетки переходят из фазы G_0 в фазу G_1 и затем из фазы G_1 в фазу S [4]. Активация лимфоцитов периферической крови человека митогенами *in vitro* сопровождается лабильзацией структуры ДНК, оцениваемой по увеличению скорости щелочной денатурации ДНК лизатов лимфоцитов, на ранних этапах активации клеток — при переходе из фазы G_0 в фазу G_1 [6], а структура ДНК интенсивно пролиферирующих *in vitro* лимфоцитов человека приближается по степени лабильзации к структуре ДНК опухолевых клеток [5]. В то же время известно, что в опухолях увеличена активность сАМР-независимых протеинкиназ [2] и снижен внутриклеточный уровень сАМР [1]. Отношение этих величин в опухолях на порядок выше, чем в соответствующей нормальной ткани и при неопухолевых заболеваниях, что позволило предложить использование этого показателя при дифференциальной диагностике рака толстой кишки [1]. Однако неясно, обусловлены ли наблюдаемые в опухолях биохимические изменения усилением пролиферации в ткани или особенностями метаболизма злокачественных клеток.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение изменений в структуре ДНК, содержании сАМР и активности протеинкиназ в нормальных лимфоцитах человека при активации их пролиферации *in vitro* поликлональным Т-клеточным митогеном конканавино А (Кон А) в сравнении с интенсивно пролиферирующими перевиваемыми *in vitro* злокачественными клетками Т-клеточной лимфомы человека Jurkat.

Методика. Мононуклеарные лейкоциты человека выделяли из свежей гепаринизированной крови по методу [10] путем центрифугирования через градиент раствора фикола — пака («Phagmacia»), отмывали средой Хенкса и использовали в качестве препаратов лимфоцитов, так как они составляли 80—95 % всех клеток. Выделенные лимфоциты культивировали в среде RPMI-1640 с 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) в концентрации 2 млн клеток на 1 мл при 37 °С в CO_2 -инкубаторе при 5 % содержании CO_2 . Кон А («Phagmacia») добавляли к клеткам в концентрации 10 мкг/мл. Клетки линии Jurkat культивировали в тех же условиях при исходной плотности 0,2 млн клеток на 1 млн.

Структуру ДНК клеток изучали прямым флуориметрическим методом с бромистым этидием [9] в модификации [12]. Клетки лизировали, доводили pH до 12,8 в течение 30 мин при 0 °С и проводили щелочную денатурацию в течение 1 ч при 15 °С. Скорость щелочной денатурации ДНК оценивали в процентах ДНК, остающейся в форме двуниевой ДНК (дДНК) после 1 ч инкубации лизата клеток при 15 °С по формуле:

$$D = \frac{P - B}{T - B} \times 100 \%,$$

где B — фоновая флуоресценция проб, определяемая после обработки лизатов ультразвуком и щелочью (pH 12,8) для полной денатурации ДНК; T — полная флуоресценция, определяемая дДНК и флуоресцирующими примесями без обработки щелочью; P — флуоресценция дДНК, оставшейся после щелочной денатурации. Флуориметрию проводили на флуориметре «Jasco FP 550» при длине волны возбуждения 520 нм и эмиссии 590 нм.

Интенсивность биосинтеза ДНК оценивали по включению 3H -тимидина (1 мКи/well, 40 мКи/ммоль) в кислотонерастворимую фракцию клеток за 2 ч инкубации с клетками в 96-луночной плате (Costar) в полной среде RPMI-1640 с 10 мМ НЕРЕС и 10 % ФБС. Для радиометрии клетки собирали на фильтры и отмывали кислотоустойчивыми продуктами 5 % трихлоруксусной кислотой на автоматическом устройстве для сбора клеток (Harvester, «Flow»).

Для определения сАМР клетки промывали физиологическим раствором и хранили в 96 % спирте при —70 °С. Клетки разрушали обработкой ультразвуком (2—3 раза по 10 с), белки гомогената денатурировали в кипящей водной бане за 3 мин, осаждали (20 000 г, 5 мин) и растворяли в 1 н. NaOH для определения их количества по методу Лоури. Безбелковый спиртовой экстракт клеток, содержащий сАМР, высушивали при 60—80 °С, растворяли в трис-ЭДТА-буфере набора для определения сАМР (фирма «Amersham») и определяли количество сАМР с помощью этого набора. Содержание сАМР рассчитывали на 1 млн клеток или на 1 мг общего количества белка.

Для определения активности протеинкиназ отмывые от культуральной среды клетки суспендировали в буфере для гомогенизации [2], разрушали на ультразвуковой установке (2 раза по 10 с), центрифугировали (20 000 г, 10 мин) и в экстракте определяли активность сАМР-зависимых гистонкиназ (ГК) по фосфорилированию *in vitro* гистона H1 в присутствии 5 мкМ сАМР и активность сАМР-независимых казеинкиназ (КК) по фосфорилированию другого модельного субстрата — казеина [2].

Статистическую обработку данных проводили по методу Стьюдента, корреляционный анализ — на микрокомпьютере «Hewlett Packard HP 85».

Результаты и обсуждение. Структуру ДНК, содержание сАМР и активность протеинкиназ в сопоставлении с интенсивностью биосинтеза ДНК изучали в свежeweделенных лимфоцитах периферической крови человека, лимфоцитах в культуре без стимулирующих пролиферацию добавок, лимфоцитах, культивированных в присутствии Кон А, и опухолевых клетках Т-лимфомы Jurkat.

При изучении структуры ДНК клеток по скорости ее щелочной денатурации показателем служит величина D (см. раздел «Методика»). Она определяется количеством одонитевых разрывов и щелочлабильных сайтов, которые в процессе щелочного лизиса превращаются в разрывы, и снижение величины D свидетельствует о накоплении в структуре ДНК одонитевых разрывов и щелочлабильных сайтов.

В препаратах свежeweделенных лимфоцитов она составляет $79,9 \pm 1,5 \%$. Эту величину принимали за 100 % при анализе динамики изменений структуры ДНК в процессе активации лимфоцитов и при сравнении со структурой ДНК клеток Jurkat. Как следует из рис. 1, перевод лимфоцитов периферической крови человека в культуру сопровождается лабильзацией структуры их ДНК и через 1, 2 и 3 сут культивирования величина D снижается на 18, 32 и 36 % соответственно. Эти изменения очень близки для интактных и стимулированных Кон А клеток, различия составляют лишь 5—15 %, в то время как по интенсивности включения 3H -тимидина на 3-и сутки

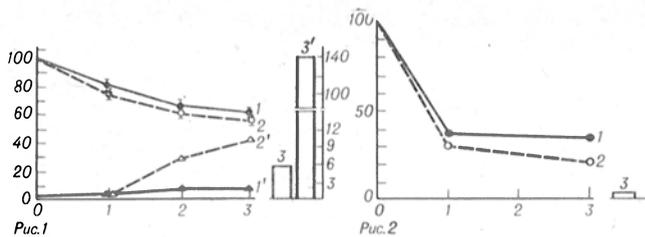


Рис. 1. Структура ДНК (1, 2, %) и интенсивность пролиферации (1', 2', 3') в интактных (1, 1') и КонА-стимулированных (2, 2') лимфоцитах и клетках линии Jurkat (3, 3').

По оси абсцисс здесь и на рис. 2 и 3 — время инкубации, *in vitro*, сут; по оси ординат: слева — величина D, % от ее значения в свежесыделенных лимфоцитах, справа — индекс интенсивности пролиферации по отношению к свежесыделенным лимфоцитам.

Рис. 2. Уровень сАМР в интактных (1) и Кон А-стимулированных (2) лимфоцитах и клетках линии Jurkat (3).

По оси ординат — уровень сАМР, % от уровня в свежесыделенных лимфоцитах.

Кон А-стимулированные лимфоциты превосходят интактные в 10 раз. Таким образом, лабилизация структуры ДНК происходит на ранних этапах активации лимфоцитов (1-е сутки) и незначительно увеличивается в дальнейшем при усилении их пролиферации.

В опухолевых клетках Jurkat величина D составляет $20,9 \pm 2,3$ %, т. е. 25 % от величины D свежесыделенных лимфоцитов. В то же время включение ^3H -тимидина в их ДНК в 300 раз выше, чем в нестимулированные лимфоциты. Степень лабилизации ДНК и интенсивность пролиферации клеток Jurkat значительно выше, чем в Кон А-стимулированных лимфоцитах.

Содержание сАМР в свежесыделенных лимфоцитах человека в среднем составляет $1,5 \pm 0,15$ нмоль сАМР на 1 млн клеток, что соответствует литературным данным [11], однако у некоторых доноров эта величина достигала 7 нмоль на 1 млн клеток. Переведение лимфоцитов в культуру сопровождается резким снижением уровня сАМР в течение 1-х суток культивирования (рис. 2). Такие же изменения происходят и в присутствии Кон А. На 3-и сутки культивирования содержание сАМР снижено в 10 раз по сравнению со свежесыделенными лимфоцитами, что всего в 2 раза превышает содержание сАМР в опухолевых клетках Jurkat. В последних содержание сАМР составляет $0,08 \pm 0,02$ нмоль на 1 млн клеток.

При исследовании протеинкиназ никакой закономерности в изменении активности ГК в лимфоцитах в разном состоянии не обнаружено. В то же время наблюдается возрастание активности КК при стимуляции клеток к пролиферации (рис. 3). Их активность увеличивается в 2—2,5 раза уже в течение 1-х суток культивирования лимфоцитов с Кон А и в пик пролиферации достигает активности этих ферментов в опухолевых клетках Т-лимфомы. В отсутствие митогена активность КК увеличивается в течение 1-х суток после переведения лимфоцитов в культуру, но в последующие сутки она снижается и на 3-и сутки культивирования достигает уровня КК в свежесыделенных лимфоцитах.

Таким образом, при стимуляции покоящихся лимфоцитов к пролиферации в них снижается уровень сАМР и возрастает активность КК. Оба

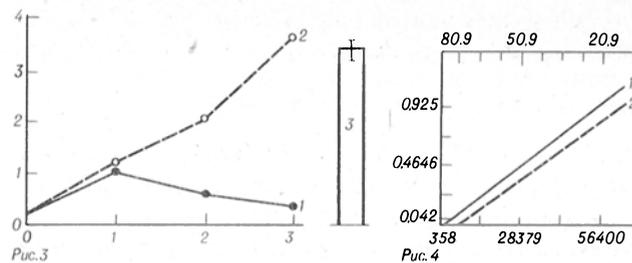


Рис. 3. Активность КК в интактных (1) и Кон А-стимулированных лимфоцитах (2) и клетках линии Jurkat (3).

По оси ординат — активность КК, нмоль/мин на 1 млн клеток.

Рис. 4. Корреляция относительной активности КК с интенсивностью биосинтеза ДНК (1) и скоростью щелочной денатурации ДНК (2) в лимфоидных клетках.

По оси абсцисс: сверху — величина D, %, внизу — включение ^3H -тимидина, нми/мин; по оси ординат — отношение КК/ГК/сАМР.

свойства особенно выражены в опухолевых клетках Jurkat.

Ранее при анализе уровня сАМР активности ГК и КК в слизистой оболочке толстой кишки и желудка человека наиболее информативными для дифференциальной диагностики злокачественных опухолей оказались показатели относительной активности КК, рассчитываемые для биопсий толстой кишки как отношение активности КК к содержанию сАМР (КК/сАМР) в том же образце ткани [1], а для биопсии желудка — как отношение КК/ГК/сАМР [3]. Мы рассчитали оба показателя относительной активности КК в стимулированных и нестимулированных лимфоцитах и клетках Т-лимфомы и сопоставили их с интенсивностью биосинтеза ДНК в этих клетках. Оказалось, что оба показателя коррелируют с пролиферативной активностью клеток: коэффициент корреляции включения ^3H -тимидина с показателем КК/ГК/сАМР, в котором значения всех величин рассчитывали на 1 мг белка, был равен 0,84 (рис. 4, 1), а для показателя КК/сАМР, в котором обе величины рассчитывали на 1 млн клеток, $r=0,96$.

Сопоставление значений относительной активности КК с изменениями в структуре ДНК выявило положительную корреляцию между отношением КК/ГК/сАМР и скоростью щелочной денатурации (D) (см. рис. 4, 2) ($r=0,82$).

Приведенные данные позволяют заключить, что увеличение относительной активности КК в клетках отражает интенсивность их пролиферации.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что синхронная лабилизация структуры ДНК, снижение концентрации сАМР и увеличение активности КК обнаружены как в нестимулированных лимфоцитах через 1 сут инкубации в питательной среде *in vitro*, что может быть связано со спонтанным переходом покоящихся клеток из фазы G_0 в фазу G_1 под действием эндогенных факторов, так и в Кон А-стимулированных лимфоцитах задолго до начала их пролиферации. Поэтому обнаруженные изменения в структуре ДНК и в системе белкового фосфорилирования можно отнести к ранним событиям перехода клеток от состояния покоя к пролиферации.

В Кон А-стимулированных лимфоцитах увеличение щелочлабильных сайтов отмечено через 1—

3 ч после добавления митогена [6]. Синхронность лабилизации структуры ДНК и снижения внутриклеточной концентрации сАМР позволяют предположить, что регуляция лабилизации структуры ДНК при активации покоящихся клеток связана с уровнем сАМР. Действительно, добавление дибутирил-сАМР к пролиферирующим лимфоцитам возвращает структуру ДНК к состоянию, соответствующему свежесыведенным лимфоцитам [7], и ингибирует пролиферацию лимфоцитов [8]. По-видимому, определенный уровень щелочеллабильных сайтов в ДНК определяет такую топологию этой макромолекулы, которая необходима для репликации ДНК, т. е. регуляция пролиферации клеток, возможно, опосредована конформацией их ДНК. Так, введение в культуру лимфоцитов рекомбинантного интерферона (1000 ЕД/мл) до добавления митогена полностью предотвращает как лабилизацию структуры ДНК лимфоцитов в течение 3 сут культивирования, так и их пролиферацию [7]. Высокая степень лабилизации структуры ДНК опухолевых клеток, возможно, связана с нарушением механизмов ее регуляции на уровне сАМР, который понижен как в культивируемых опухолевых клетках (см. рис. 2), так и в спонтанных опухолях человека [1, 3], что создает условия для неограниченной пролиферации злокачественных клеток.

Обнаруженная в данном исследовании высокая степень корреляции активации системы сАМР-независимого фосфорилирования белков (активности КК) с уровнем включения тимидина в ДНК клеток позволяет констатировать ее связь с интенсивностью пролиферации. В то же время относительный показатель сАМР-независимого фосфорилирования КК/ГК/сАМР, учитывающий уровень активности протеинкиназ и концентрацию сАМР в клетках, коррелирует как с интенсивностью пролиферации, так и с уровнем щелочеллабильных сайтов в ДНК. Его использование позволяет оценить, по-видимому, нарушение как сАМР-зависимых процессов регуляции пролиферации, в том числе и на уровне регуляции структуры ДНК, так и интенсивности пролиферации клеток, что делает его информативным для дифференциальной диагностики злокачественных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В. Б., Левитан М. Х., Гроздова И. Д. и др. // *Вопр. онкол.*— 1986.— № 8.— С. 45—53.
2. Гроздова И. Д., Михайловский А. В., Северин Е. С. и др. // *Вопр. мед. химии.*— 1986.— № 3.— С. 104—108.
3. Гроздова И. Д., Прохорова Л. В., Мамаева Е. Г. и др. // *Вопр. онкол.*— 1990.— № 7.— С. 822—826.
4. Епифанова О. И., Трекких В. В., Подуновский В. А. Покоящиеся клетки.— М., 1983.
5. Москалева Е. Ю., Дяченко Л. В., Миронова С. Б. и др. // *Гематол. и трансфузиол.*— 1989.— № 4.— С. 40—42.
6. Москалева Е. Ю. // *Бюл. exper. биол.*— 1989.— № 9.— С. 335—337.
7. Москалева Е. Ю. // Там же.— 1990.— № 10.— С. 417—420.
8. Albert D., Kovalski J., Nodzenski E. et al. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1990.— Vol. 167.— P. 383—390.
9. Birnboim H. C., Doly J. // *Cancer Res.*— 1981.— Vol. 41.— P. 1889.
10. Boyum A. // *Scand. J. clin. Lab. Invest.*— 1968.— Suppl. 97.— P. 31.
11. Motulsky H. J., Smith D., Terman B. I. et al. // *J. Cycl. Nucl. Prot. Phos. Res.*— 1986.— Vol. 11.— P. 329—343.

12. Thierry D., Rigaud O., Duranton J. et al. // *Radiat. Res.*— 1985.— Vol. 102.— P. 347.

Поступила 20.02.91

CONTENT OF cAMP, ACTIVITY OF PROTEIN KINASES AND DNA STRUCTURE IN RESTING AND PROLIFERATING LYMPHOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD AND IN HUMAN T-LYMPHOMA CELLS

E. Yu. Moskaleva, I. D. Grozdova

All-Union Centre of Molecular Diagnosis, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Alterations of DNA structure, of cAMP content, of cAMP-dependent histokinases (HK) activity and cAMP-independent casein kinases (CK) activity were studied during transformation of resting cells to proliferation. These patterns were studied in human lymphocytes from peripheral blood immediately after their isolation and after cultivation within 3 days in presence of concanavaline A (ConA) or without the mitogene as well as in cultivated cells of human T-lymphoma Jurkat. Increase in content of alkaline labile sites in DNA, in activity of CK as well as distinct increase in content of cAMP were detected within the first 18 hrs of lymphocytes cultivation both in presence of ConA or without it. Early steps of cell transformation from G₀ phase to G₁ may be related to these alterations observed. Only slight increase in content of the alkaline labile sites in DNA and decrease in cAMP content were found in both these cell cultures. Activity of CK in the lymphocytes culture not containing ConA was decreased down to initial level, while in presence of the mitogene the enzymatic activity was increased and within 3 days it reached the level of CK activity in Jurkat cells. The rate of CK relative activity, calculated as CK/cAMP or CK/HK/cAMP ratios for each cell preparation, correlated with DNA biosynthesis rate measured by ³H-thymidine incorporation. The data obtained suggest that these patterns, used in differential diagnosis of human large intestine and gastric tumors, demonstrated also the intensity of tissue proliferation.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.24-006.6-092:612.6.05]-07

И. Ф. Никифорова, М. Г. Максимишина,
В. Г. Лемехов, П. Г. Князев

РОЛЬ КОНСТИТУТИВНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ И ПЕРЕСТРОЕК ОНКОГЕНА HRAS 1 В РАЗВИТИИ РАКА ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА

НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова, Ленинград

Онкогены семейства RAS причастны к развитию широкого спектра опухолей человека и животных. В опытах по трансфекции, а также с помощью реакции полимеризации цепи ДНК термочувствительной полимеразой в некоторых типах первичных опухолей человека обнаружено от 25 до 90 % случаев мутаций в горячих кодонах онкогенов HRAS1, KRAS2 или NRAS [1, 2, 15]. Наряду с качественным механизмом активации генов RAS не меньшее значение в канцерогенезе у человека может иметь и количественный: повышение экспрессии онкогенов RAS показано примерно в половине новообразований.

Одним из наиболее часто экспрессирующихся в злокачественных опухолях человека онкогенов является HRAS1. Однако мутации в этом гене выявляются в целом реже, чем в других онкогенах RAS — KRAS2 и NRAS. HRAS1 обладает полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) в геноме человека, обусловленным пали-

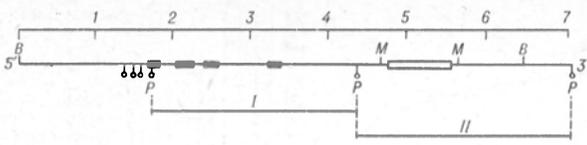


Рис. 1. Схема расположения кодирующих последовательностей (темные прямоугольники) и области ВТП (светлый прямоугольник) онкогена EJ-HRAS1 [3].

B — BamHI, *M* — MspI, *P* — PvuII, *I* — P-фрагмент (2,6 т. п. н.); *II* — P-фрагмент (2,7 т. п. н.). Вертикальными линиями отмечены сайты рестрикции эндонуклеаз BamHI, PvuII и MspI.

чием на 3'-конце гена области вариабельно-тапдемного повтора (ВТП) последовательности, длиной 28 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.) [3] (рис. 1). Эволюционно оказались отобраны 4 варианта амплификации этой последовательности или 4 основных аллеля (ОА) гена [12], составляющие 96 % от всех выявленных аллелей и обозначенные А1 (64 % случаев), А2 (12 %), А3 (11 %) и А4 (9 %) [10, 11]. Помимо ОА, в геноме человека было найдено несколько редких аллелей (РА), имеющихся у 4—5 % людей и незначительно, на 0,1—0,2 т. п. н., отличающихся по своему размеру от ОА.

У онкологических больных обнаружили [11] по сравнению со здоровыми донорами вдвое большую частоту РА (10 и 5 %). Предполагают, что область ВТП онкогена HRAS1 может вести себя как энхансер; в опытах по трансфекции показано увеличение в 5—10 раз экспрессии HRAS1 под влиянием ВТП [12]. Выявлена не только значительно повышенная частота РА у больных раком молочной железы (РМЖ) (41 % по сравнению с 9 % в здоровой популяции), но и связь РА с агрессивным течением опухолевого заболевания [13]. Однако были представлены также данные о примерно равной доле РА у больных, в том числе РМЖ, и у здоровых людей [6, 9, 17, 18].

Что касается ОА, то в большинстве исследований ПДРФ протоонкогена HRAS1 не было найдено ассоциаций каких-либо его аллелей с предрасположенностью к развитию рака. Существуют только 4 работы, в которых была установлена повышенная частота самого большого аллеля А4 у больных немелкоклеточным раком легкого (РЛ), раком толстой кишки (РТК) и меланомой [8, 9, 19].

В данной работе представлен анализ распределения аллелей протоонкогена HRAS1 среди больных одним из самых распространенных раков у мужчин — РЛ в сравнении со здоровой популяцией людей. В указанном контексте изучены пере-

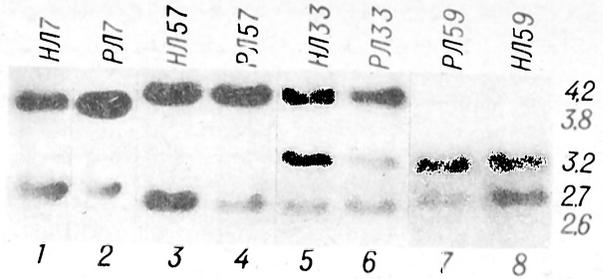


Рис. 2. Случаи амплификации и делеции одного из аллелей онкогена HRAS1 в карциномах легкого.

Здесь и на рис. 5: размеры PvuII-рестриционных фрагментов в т. п. н., соответствующие четырем аллелям и смысловой части гена (2,6 т. п. н.), даны справа. *НЛ* — нормальное легкое; *РЛ* — рак легкого; цифры при *НЛ* и *РЛ* — порядковый номер историй болезни.

стройки аллелей онкогена в ДНК опухолей и, кроме того, сделана попытка вычленить клинико-патологические параметры заболевания, ассоциированные с определенным аллелем гена HRAS1.

Методика. Нами исследованы 52 первичные карциномы легкого, соответствующие неизмененные ткани и лейкоциты периферической крови. Для сравнительного анализа была взята кровь 32 здоровых доноров.

Препараты ДНК выделяли по [14]. 20 мкг ДНК гидролизуют эндонуклеазами рестрикции BamHI, PvuII, MspI и PstI (НПО «Фермент», Вильнюс). Расщепленную ДНК разделяли электрофорезом в 1 % геле агарозы и переносили на нейлоновые фильтры («Хийу-Калур», Таллинн).

BamHI-фрагмент плазмиды EJ [7] размером 6,6 т. п. н. выделяли по [14]. В реакции пик-трансляции использовали ³²P-дЦТФ (НПО «Изотоп», Ташкент). Удельная активность меченого зонда составляла не менее 10 имп/мин·мкг.

Гибридизацию осуществляли в жестких условиях: 50 % формамид, 5×SSC, 2,5×раствор Дейнхардта, 0,1 % SDS, 100 мкг/мл тРНК. Фильтры отмывали 2×SSC, 0,1 % SDS при 37 °С и 0,2×SSC, 0,1 % SDS при 65 °С, затем проводили авторадиографию.

Результаты и обсуждение. При расщеплении препаратов ДНК от здоровых доноров и больных РЛ были идентифицированы 4 ОА протоонкогена HRAS1, которые имели размеры BamHI-рестриционных фрагментов 6,6, 7,1, 7,7, 8,1 т. п. н. и PvuII-рестриционных фрагментов 2,7, 3,2, 3,8, 4,2 т. п. н. Схематическая карта онкогена HRAS1 человека (см. рис. 1) объясняет присутствие 3 PvuII-рестриционных фрагментов на представленных автографах (рис. 2 и 3): эндонуклеаза выщипывает смысловую часть гена размером 2,6 т. п. н. и один или два (при гомо- или гетерозиготности) фрагмента приведенных выше размеров.

Содержание аллелей А1 и А3 в РЛ существенно не отличается от контроля (см. таблицу). Частота аллеля А2 незначительно превышает таковую в

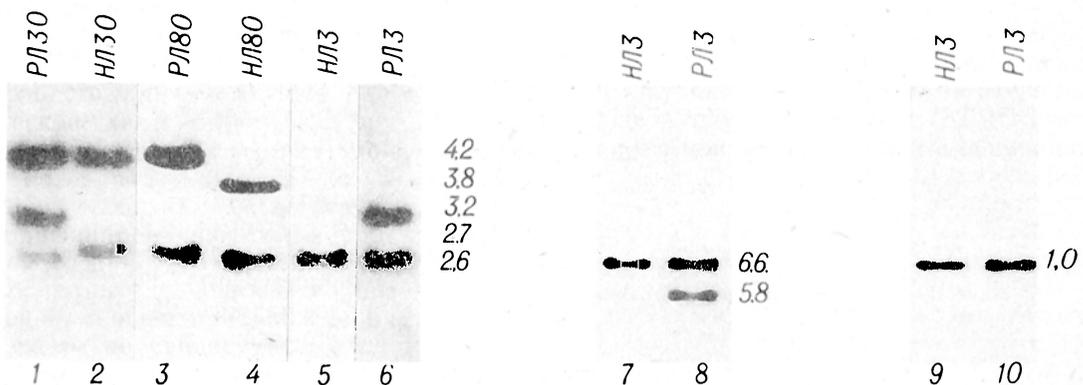


Рис. 3. Изменение длины одного из аллелей онкогена HRAS1 в карциномах легкого.

Распределение аллелей протоонкогена HRAS1 у больных РЛ и здоровых доноров

Аллель	Здоровые (ЛО)	Доноры (суммарные и литературные данные)	Больные РЛ
A1	42 (65,6)	901 (64,2)	63 (60,0)
A2	9 (14,1)	173 (12,3)	16 (15,4)
A3	7 (10,9)	153 (10,9)	10 (9,6)
A4	5 (7,8)	124 (8,8)	12 (11,5)
РА	1 (1,6)	53 (3,8)	3 (2,9)
Всего...	64	1404	104

Примечание. Суммарное число аллелей протоонкогена HRAS1 выявлено [4, 6, 8—10, 12, 17—19] у здоровых людей; в скобках — частота аллели (в % от общего числа аллелей); РА — редкие аллели протоонкогена HRAS1.

норме¹: 15,4 к 12,3 % (соотношение равно 1,25), однако почти одинакова со встречаемостью A2, выявленной в нашей группе доноров: 15,4 к 14,1 % (1,09). Частота аллели A4 однозначно выше как в сравнении со здоровой популяцией Ленинградской области (ЛО): 11,5 к 7,8 % (1,47), так и с суммарными литературными данными: 11,5 к 8,8 % (1,31).

Из 52 больных РЛ только у 3 (2,9 %) было выявлено присутствие в геноме РА протоонкогена HRAS1 со следующими значениями BamHI-рестрикционных фрагментов: 6,3, 6,8 и 8,5 т. п. н. Содержание редких аллелей у больных РЛ несколько выше, чем у здоровых доноров ЛО, но ниже соответствующего значения в суммарных литературных данных (см. таблицу). Однако сопоставление результатов с суммарной нормой представляется нам более корректным, поскольку благодаря значительному числу исследованных здоровых людей (702 человека) объективнее отражает распределение аллелей в здоровой популяции. В любом случае процент РА в РЛ настолько мал, что не может вносить значительного вклада в изменение распределения аллелей гена HRAS1 при малигнизации. Наши и литературные данные [6, 17, 19] не подтверждают гипотезу о причастности РА к возникновению и развитию злокачественных опухолей у человека.

Разделение карцином легкого на метастазирующие и неметастазирующие показало, что за счет метастазирующих, а значит, и более агрессивных опухолей происходит увеличение количества аллели A4 и уменьшение — A3 (рис. 4). Доля аллелей A1 и A2 в рассматриваемых группах РЛ практически одинакова.

Был исследован ПДРФ онкогена в мелкоклеточных и немелкоклеточных РЛ в сравнении со здоровыми донорами [9]. Частота аллели A4 в немелкоклеточных РЛ была в 4 раза ниже, чем в мелкоклеточных (15 и 4 % соответственно) и в 2 раза выше, чем в норме (15 и 8 % соответственно). Это позволило отнести аллель A4 протоонкогена HRAS1 к маркерам генетической предрасположенности к заболеванию немелкоклеточным РЛ [9].

¹ В качестве нормы использовали суммарные данные о распределении аллелей протоонкогена HRAS1 у здоровых доноров, полученные в работах [4, 6, 8—10, 12, 17—19], и наши результаты.

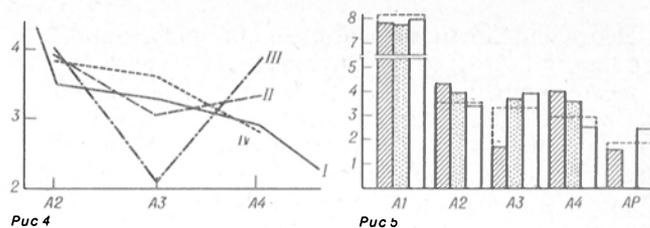


Рис. 4. Частота аллелей A2, A3 и A4 протоонкогена NRAS1 у больных РЛ с разным уровнем метастазирования.

По оси абсцисс — аллели; по оси ординат — корень квадратный из частоты аллели, %; I — норма; II — РЛ; III — РЛ с метастазами; IV — РЛ без метастазов.

Рис. 5. Изменения частот аллелей протоонкогена HRAS1 в РЛ различного уровня прогрессии.

Светлые столбики — IA, IIA стадия РЛ; столбики с точками — IB, IIB, IIIB, запятые столбики — IIIB, IV. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

Среди исследованных нами 52 случаев РЛ было 9 аденокарцином: по одному случаю недифференцированного (крупноклеточного, овсяноклеточного, тубулярного, веретенчатого, бронхоальвеолярного РЛ) и 37 плоскоклеточных РЛ (плюс 1 неохарактеризованный образец), т. е. за одним исключением (генотип A1/A2), рассматриваемые РЛ являлись немелкоклеточными. Можно предположить, что частота аллели A4 у больных РЛ ЛО ниже, чем в работе [9], из-за меньшего количества в нашей выборке агрессивных, метастазирующих РЛ.

Значительное различие метастазирующих и неметастазирующих РЛ в отношении аллелей A3 и A4 (см. рис. 4) подтверждает целесообразность такого разделения и свидетельствует о причастности аллели A4 протоонкогена к развитию агрессивных признаков при немелкоклеточном РЛ и об относительном благополучии в плане метастазирования ОА A3.

При анализе распределения аллелей протоонкогена HRAS1 среди РЛ разной стадии прогрессии оказалось, что при переходе от I стадии к IV уменьшается доля ОА A1 и почти в 2 раза увеличивается доля аллелей A2 и A4 при неизменном проценте ОА A3 (данные не представлены). Учитывая то, что стадии лишь формально характеризуют степень агрессивности заболевания, мы попытались разделить больных РЛ на группы, принимая во внимание такие параметры заболевания, как степень дифференцированности и инвазивности, скорость роста опухоли (там, где это было возможно), количество, локализация и размеры метастазов, гистологический тип карциномы, прогноз заболевания и др. В результате такого многофакторного анализа были сформированы три группы: 1-я группа — РЛ III и IV стадий (низкодифференцированные, инфильтрующие в окружающие ткани, давние 3 и более региональных метастазов, часто большого размера, а также отдаленные метастазы, неблагоприятные карциномы) — 36,5 % случаев; 2-я группа — РЛ большей частью IB, IIB и IIIA стадий (инфильтрация не отмечена, опухоли высоко- или среднедифференцированные с 0—2 метастазами) — 30,8 %; 3-я группа — РЛ IA и IIА стадий (медленно растущие, неметастазирующие опухоли небольшого размера, прогноз благоприятный) — 32,7 %.

Такое разделение РЛ, более верно отражающее, на наш взгляд, рост агрессивных признаков опу-

холей, выявило менее выраженное увеличение содержания ОА А2 от 3-й группы к 1-й по сравнению с изменением частоты А2 от I стадии к III и IV (рис. 5). Отношение доли аллеля А2 в 1-й группе к таковому в 3-й группе равно 1,56, а А4 — 2,68, т. е. флюктуация аллеля А2 в РЛ с различным развитием агрессивных признаков не столь впечатляющая, как изменения частоты аллеля А4. При этом в самой благоприятной по течению заболевания 3-й группе содержится 5,9 % ОА А4, а в 1-й группе — в 3 раза больше — 15,8 %. Наблюдается также уменьшение частоты аллеля А3 с увеличением агрессивности РЛ (см. рис. 4 и 5), что свидетельствует по меньшей мере об отсутствии связи аллеля А3 гена HRAS1 с прогрессией злокачественных признаков опухолей легкого.

У 30 из 52 исследуемых больных РЛ оперативное лечение было произведено в 1985—1986 гг. (4—5 лет назад), что дало возможность проанализировать выживаемость этих больных в зависимости от клинических параметров заболевания. Из 30 больных РЛ умерли 18, причем смертность в 1-й группе составила 57,9 %, во 2-й группе — 31,3 %, в 3-й — 11,8 %. Интересно, что 7 из 18 умерших (38,9 %) содержали аллель А4 протоонкогена HRAS1, а из 12 оставшихся в живых только 2 (16,7 %) имели аллель А4; другие аллели HRAS1 имели равную частоту в последних двух группах больных РЛ.

ПДРФ HRAS1 оказался удобен не только для исследования распределения аллелей протоонкогена, но и для выявления перестроек отдельного аллеля в опухолевой ДНК. В карциномах легкого 3 больных, имеющих генотипы А1/А4, А2/А4 и 6,8/А2, обнаружена делеция аллеля меньшего размера (см. рис. 2, 3, 5, 8), т. е. аллелей А1, А2 и РА (BamHI-рестрикционная длина которого равна 6,8 т. п. н., PvuII-рестрикционная длина — 2,9 т. п. н.) соответственно (см. рис. 2, 4, 6 и 7). Остаточный сигнал гибридизации (10—15 %) обусловлен контаминацией опухоли клетками стромы и крови, сохранившими конститутивный генотип. К сожалению, используемые нами молекулярно-гибридизационные методы не позволяют с определенностью показать потерю аллеля HRAS1 в карциномах гомозиготных больных, составляющих 42,3 % от общего числа РЛ. Можно предположить, что в 22 образцах гомозиготных РЛ делеция одного из аллелей происходит с такой же частотой, что и в 30 гетерозиготных. В таком случае частота делеций в РЛ равна 10 %. В 2 случаях РЛ с генотипом А1/А4 найдена незначительная (3—4 копии) амплификация аллеля А4 в ДНК опухолей, аллель А1 сохранял 1 копию (см. рис. 2, 1 и 2).

Рис. 5 иллюстрирует другого рода поломки локуса онкогена HRAS1 — изменение размера одного из аллелей. При генотипе А1/А4 в ПЛЗО (макроскопически неизменная ткань легкого) в РЛЗО сохранялся аллель А4, а второй аллель имел большую, чем А1, длину (см. рис. 3, 1 и 2). Расщепление этих образцов рестриктазами PstI и MspI, вырезающими область ВТП (см. рис. 1), показало, что перестройка аллеля А1 в опухоли произошла за счет увеличения длины ВТП до размеров, соответствующих аллелю А2. Аналогичный рестрикционный анализ выявил в РЛ80 перестройку аллеля А3 в А4 (конститутивный генотип этого больного А1/А3; см. рис. 3, 3 и 4).

Необычная перестройка найдена в РЛ3 (генотип этого больного А1/А1; см. рис. 3, 5, 7, 9). Длина BamHI-рестрикционного фрагмента опухолевой ДНК, соответствующего одному из аллелей онкогена HRAS1, уменьшена до 5,8 т. п. н., длина другого фрагмента — до 6,6 т. п. н., что соответствует аллелю А1 (см. рис. 3, 7, 8). Однако при гидролизе этого образца рестриктазами PstI и MspI выявлен единственный фрагмент, соответствующих по своему размеру ОА А1 (см. рис. 3, 9, 10). Очевидно, перестройка аллеля происходит не за счет уменьшения области ВТП. С другой стороны, в результате PvuII-рестрикции получен, наоборот, увеличенный на 0,8 т. п. н. фрагмент, соответствующий перестроенному аллелю (см. рис. 3, 5, 6). Следовательно, в данном случае нарушается 5'-концевая часть гена HRAS1 (см. рис. 5).

Из 8 перестроек аллелей HRAS1 2 выявлены в опухолях IA, IIA стадий: делеция аллеля А2 при генотипе А2/А4 и РА А6 при генотипе А6/А2. Изменение длины А1 — А2 и амплификация аллеля А4 (оба генотипа А1/А4) найдены в РЛ IIB стадии. Остальные 4 поломки обнаружены в карциномах IIIB, IV стадий: амплификация аллеля А4 (генотип А1/А4), увеличение длины А3 до размеров А4 (А1/А3), делеция А1 (А1/А4) и нарушение 5'-концевой части одного из аллелей А1 гена HRAS1 (А1/А1), причем последние 3 больных имелиотягощенный семейный анамнез (все 3 больных умерли через 2—6 мес после операции в возрасте 57, 58 и 61 года). Кроме указанных пациентов, еще у 2 больных РЛ отмечен рак среди ближайших родственников; эти РЛ имели генотип А1/А1 и характеризовались IIA и IIB стадиями.

Обобщая изложенные данные о поломках локуса онкогена HRAS1 в злокачественных опухолях легкого, следует обратить внимание на то, что в 5 из 11 случаев (или 45 %) РЛ, имеющих аллель А4, выявлена либо перестройка другого аллеля, либо умножение копий самого аллеля А4; одна из карцином легкого из-за изменения длины аллеля «приобрела» аллель А4, в других же РЛ, не содержащих этот аллель, обнаружено всего два нарушения гена HRAS1 (или 5 % случаев).

Таким образом, повышенная частота аллеля А4 онкогена HRAS1 в РЛ сопряжена с ростом агрессивных признаков опухоли и низкой выживаемостью больных РЛ, а также достоверно коррелирует с поломками локуса HRAS1 ($p < 0,01$), результатом которых является повышение доли А4 в карциномах. По всей видимости, аллель А4 HRAS1 имеет серьезное значение в прогрессии РЛ.

Существует всего несколько публикаций, в которых была установлена повышенная частота самого большого аллеля А4 у больных немелкоклеточным РЛ, РТК и меланомой [8, 9, 19]. Предполагают, что аллель А4 HRAS1 опосредованно или прямо благодаря особенностям функционирования области ВТП связан с возникновением этих карцином и может быть использован в качестве маркера генетической предрасположенности к развитию РЛ, РТК и меланомы. Обращает на себя внимание тот факт, что для появления и развития указанных новообразований большое значение имеют экзогенные факторы риска.

Результаты нашей работы, касающиеся РЛ, полностью подтверждают фактические данные упомянутых публикаций. Более того, благодаря

сравнительному анализу распределения аллелей в разных по стадии заболевания группах немелкоклеточного РЛ и характерным поломкам в опухолевой ДНК эти результаты углубляют представления о значении аллеля А4 в прогрессии указанного типа рака. Однако необходимо отметить, что именно выявленная ассоциация аллеля А4 онкогена HRAS1 с активно метастазирующими карциномами III или IV стадий, а также специфика перестроек, в результате которых аллель остается либо неизменным, либо его копияность увеличивается, позволяют расценивать аллель А4 скорее как эндогенный фактор риска наряду с характерными для РЛ экзогенными факторами (например, курением). Таким образом, гипотеза о прямой или опосредованной связи одного из аллелей онкогена HRAS1 с наследственным к заболеванию РЛ локусом генома [9] нуждается в дальнейшем исследовании и представленными данными прямо не подтверждается. Биологические причины показанных в данном исследовании различий функционирования аллелей онкогена HRAS1 в канцерогенезе у человека пока неясны. Помимо результатов молекулярно-генетического скрининга аллельного полиморфизма, привлекают интерес данные о различиях в структуре основных аллелей HRAS1, не обусловленных областью ВТП. В геноме человека обнаружено два XhoI аллеля HRAS1, один из которых объединял А1 и А3 ВТП-аллели онкогена, другой — аллели А2 и А4 [5]. Кроме того, аллель А4 отличается от всех других ОА онкогена HRAS1 двумя дополнительными TaqI-рестрикционными сайтами в области ВТП [16].

По данным нашей лаборатории, аллели А2, А3 и А4 протоонкогена HRAS1 имеют различное значение в развитии неоплазм разной локализации у человека [11]. В частности, в возникновении рака молочной и щитовидной желез и рака яичников аллель А2 HRAS1 в отличие от А4 играет большую роль, тогда как в РЛ и РТК выделяется аллель А4, а значение А2 снижено. По-видимому, скрининг широкого спектра первичных опухолей, комплексный анализ конститутивных особенностей гена HRAS1, его перестроек в опухолевой ДНК и клинических параметров заболеваний, а также модельные эксперименты с использованием отдельных аллелей позволяют глубже понять регуляторный характер области ВТП онкогена HRAS1 и возможные механизмы его активации как на клеточном, так и на организменном уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Князев П. Г., Шефер Р., Вилликс К. и др. // Докл. АН СССР.— 1985.— № 4.— С. 1011—1013.
2. Bos J. L. // Cancer Res.— 1989.— Vol. 49.— P. 4682—4689.
3. Capon D. J., Chen E. Y., Levinson A. D. et al. // Nature.— 1983.— Vol. 302.— P. 33—37.
4. Ceccherini-Nelli L., De Re V., Viel A. et al. // Brit. J. Cancer.— 1987.— Vol. 56.— P. 1—5.
5. Chandler L. A., Ghazi H., Jones P. A. et al. // Cell.— 1987.— Vol. 50.— P. 711—717.
6. Gerhard D. S., Dracopoli N. C., Bale S. J. et al. // Nature.— 1987.— Vol. 325.— P. 73—75.
7. Goldfarb M., Shimizu K., Perucho M., Wigler M. // Ibid.— 1982.— Vol. 296.— P. 404—407.
8. Hayward N. K., Nancarrow D. J., Parsons P. G. et al. // Hum. Genet.— 1989.— Vol. 83.— P. 395—396.
9. Heighway J., Thatcher N., Cerny T., Hasleton P. S. // Brit. J. Cancer.— 1986.— Vol. 53.— P. 453—457.
10. Kasperczyk A., Mermier B. A., Parkinson D. R. et al. //

- Amer. J. hum. Genet.— 1989.— Vol. 45.— P. 689—696.
11. Krontiris T. D., DiMartino N. A., Colb M., Parkinson D. // Nature.— 1985.— Vol. 313.— P. 369—372.
12. Knyazev P. G., Nikiforova I. F., Serova O. M., Pluzhnikova G. F. // Neoplasma.— 1990.— Vol. 37, N 6.— P. 647—655.
13. Lidereau R., Escot Ch., Theillet Ch. et al. // J. nat. Cancer Inst.— 1986.— Vol. 77.— P. 697—701.
14. Maniatis T., Fritsh E. F., Sambrook J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual.— Cold Spring Harbor, 1982.
15. Marshall C. J. // Oncogenes and Growth Control / Eds. P. Kahn, T. Graf.— Berlin, 1989.— P. 192.
16. Pierotti M., Radice P., Biunno I. et al. // Cytogenet. Cell Genet.— 1986.— Vol. 43.— P. 174—177.
17. Thein S. L., Oscier D. G., Flint J., Wainscoat J. S. // Nature.— 1986.— Vol. 321.— P. 84—85.
18. White G. R. M., Heighway J., Williams G. T., Scott D. // Brit. J. Cancer.— 1988.— Vol. 57.— P. 526—529.
19. Wylie F. S., Wynford-Thomas R., Lemoine N. R. et al. // Ibid.— P. 135—138.

Поступила 15.02.91

ROLE OF CONSTITUTIONAL PECULIARITIES AND REARRANGEMENT OF HRAS1 ONCOGENE IN DEVELOPMENT OF HUMAN LUNG CANCER

I. F. Nikiforova, M. G. Maximishina, V. G. Lemekhov, P. G. Knyazev

N. N. Petrov Institute of Oncology, Ministry of Public Health of the USSR, Leningrad

Length polymorphism of restriction fragments of oncogene HRAS1 was studied in 52 patients with lung cancer as compared with corresponding normal tissues and leukocytes of these patients and of healthy volunteers. Enhanced frequency of one of main alleles of HRAS1 A4 was found to correlate with development of the disease aggressive symptoms. Alterations in the HRAS1 locus of tumoral DNA appear to correlate distinctly with the elevated frequency of the allele ($P < 0.01$). Relationship between the allele A4 and active metastases spreading in lung cancer of the III-IV stages as well as specific rearrangements as a result of which allele A4 maintained unaltered or even amplified in carcinomas enabled to suggest that the allele A4 of HRAS1 oncogene serves as an endogenous risk factor in impairment with non-small cellular lung cancer in addition to typical exogenous factors such as smoking.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616-006.3.04-092.9-085.277.3.015.2:615.849]-059:616.153.455-008.61-021.7]-036.8-07

А. Т. Пикунев, Н. М. Орел, М. Ф. Кукулянская, С. И. Мохорева, М. М. Филимонов, И. П. Хрипченко, В. М. Черногузов

КОМБИНИРОВАННОЕ ВЛИЯНИЕ ГИПЕРГЛИКЕМИИ С ХИМИО- И ЛУЧЕВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ НА СОСТОЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В НЕКОТОРЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ САРКОМАХ КРЫС

Белорусский университет им. В. И. Ленина, Минск

Известно, что с помощью искусственной гипергликемии удается модифицировать не только радио-, но и химиочувствительность опухолей [2]. Однако многие аспекты проблемы как в эксперименте, так и в клинике остаются неясными. В частности, отсутствуют четкие представления о механизмах действия этих факторов на обмен веществ в опухоли, недостаточно разработаны последовательность и методология проведения химио- и лучевых воздействий в комбинации с гипер-

гликемией. Основным энергообеспечивающим процессом в опухоли является гликолиз. Актуальность изучения изменений его активности и свойств других ключевых ферментов углеводно-энергетического и связанного с ним аминокислотного обмена, содержания субстратов этих ферментов при различного рода воздействиях на опухоль определяется прежде всего тем, что они отражают сдвиги, сопровождающие процесс регрессии опухоли.

Исследованиями активности гексокиназы — ГК (КФ 2.7.1.1), лактатдегидрогеназы — ЛДГ (КФ 1.1.1.27) и ее изоферментов, сукцинатдегидрогеназы — СДГ (КФ 1.3.99.1), α -оксoglутаратдегидрогеназы — α -ОГДГ (КФ 1.2.4.2), аланинаминотрансферазы — АлАТ (КФ 2.6.1.1), Mg^{2+} -АТФазы (КФ 3.6.1.2), содержания пирувата, лактата, пиридоксальфосфата (ПАЛФ) и пиридоксаминфосфата (ПАМФ) было показано, что введение высоких доз глюкозы усиливает ряд эффектов цитостатиков и сверхвысокочастотной (СВЧ) гипертермии [8, 9], а также терморadiационного воздействия [7] в субклеточных фракциях сарком 45, М-1 и карциносаркомы Уокер 256 крыс. Предпочтительными оказались варианты, в которых искусственную гипергликемию проводили через 24 ч после термолучевой терапии или комбинации цитостатика и СВЧ-гипертермии. Эти данные позволили предположить, что гипергликемию можно использовать в качестве модификатора действия химиотерапевтических препаратов в сочетании с рентгеновским облучением.

Методика. Экспериментальная часть работы выполнена на беспородных белых крысах обоего пола массой 130—180 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Перевивку опухолевых штаммов осуществляли в паховую область по методу [14]. Животных декапитировали на 12—13-й день развития сарком 45 и М-1 и на 7—8-й день развития карциносаркомы Уокер 256. В опытах было использовано 100 крыс (по 6—7 в серии).

Воздействия осуществляли следующим образом. Циклофосфан вводили однократно внутримышечно в дозе 80 мг/кг, адриабластин — внутривенно в дозе 5 мг/кг на основании данных [4, 10]. Для создания гипергликемии крысам-опухоленосителям внутривенно однократно вводили 40 %

раствор глюкозы в дозе 6 г/кг [5]. Контроль за насыщением организма глюкозой осуществляли путем определения ее уровня в крови через фиксированные промежутки времени. Локальное рентгеновское облучение проводили на аппарате РУМ-11 (напряжение 200 кВ, сила тока 20 мА, фильтр А1 3 мм, мощность поглощенной дозы 0,63 Гр/мин). Общая доза облучения опухоли 10 Гр. Облучение проводили на фоне нейролептанальгезии: дроперидол с фентанилом (2:1) по 0,3 мл на 100 г массы.

При введении цитостатика, облучении и гипергликемии в различных сочетаниях интервал между воздействиями составлял 24 ч. Основанием для выбора режимов, доз и интервалов послужили проведенные ранее исследования отдельных показателей углеводно-энергетического метаболизма в опухолях через фиксированные промежутки времени [5—9]. Крыс использовали в опыт через 2 ч после последнего воздействия. Контролем служили интактные крысы-опухоленосители.

Приготовление гомогенатов и выделение субклеточных фракций проводили по методу [20] с модификациями. Активность ГК исследовали по методу [17] по убыли глюкозы за 15 мин инкубации при 37 °С. Общую активность ЛДГ определяли по [16]. Активность изоферментов ЛДГ рассчитывали, исходя из общей активности после разделения их методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле, окрашивание проводили по [11], денситометрирование — на БИАП-170. Содержание пировиноградной и молочной кислот исследовали энзиматическим методом [15]. Активность СДГ и α -ОГДГ определяли с помощью [18], активность АлАТ изучали по [2], Mg^{2+} -АТФазы — по методу [12]. Содержание фосфора определяли по [19]. Количество пиридоксальных коферментов (ПАЛФ и ПАМФ) находили по [3]. Полученный экспериментальный материал обработан методом биологической статистики [13].

Результаты и обсуждение. Поиск рациональных методов и условий применения различных воздействий при лечении новообразований должен опираться на учет особенностей обмена веществ в опухолях разного типа. При обсуждении данных для оценки эффективности комбинированных воздействий на развитие опухолей разных штаммов мы сочли целесообразным сопоставить изменения активности каждого фермента и содержания субстрата параллельно в 3 опухолях. Так, в саркоме 45 (рис. 1) отмечено статистически достоверное снижение скорости фосфорилирования глюкозы в субклеточных фракциях при всех схемах воздействий, особенно при введении цитостатиков и облучении перед гипергликемией. В саркоме М-1 (рис. 2) более четко

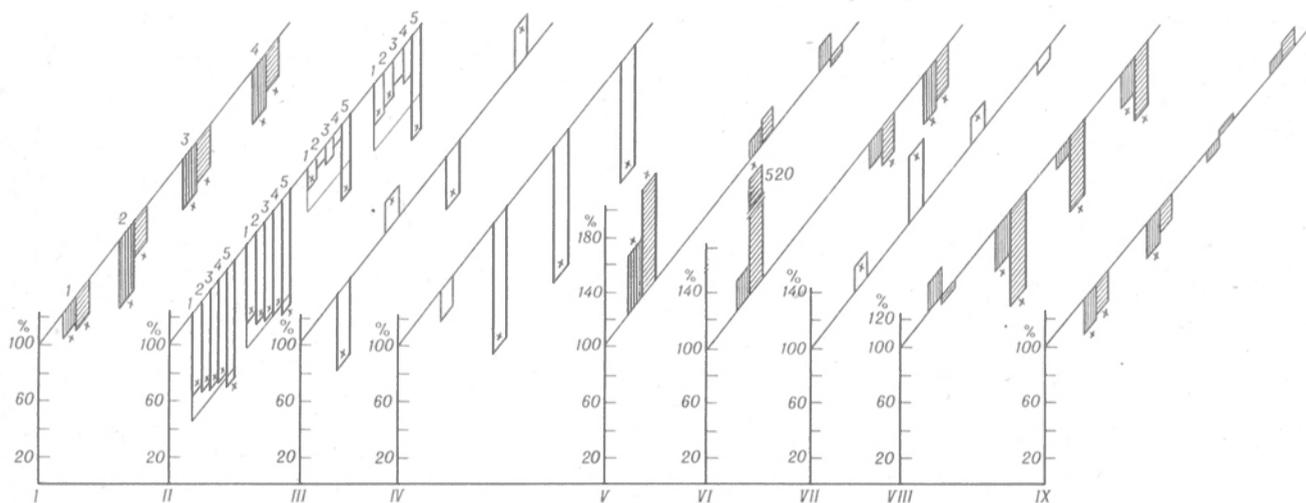


Рис. 1. Влияние химиотерапевтических веществ в сочетании с рентгеновским облучением и искусственной гипергликемией на активность ферментов и содержание субстратов в саркоме 45 крыс.

По оси ординат — % к контролю. I — ГК; II — ЛДГ и ее изоферменты 1—5; III — лактат; IV — пируват; V — СДГ; VI — α -ОГДГ; VII — Mg^{2+} -АТФазы; VIII — АлАТ; IX — пиридоксальные коферменты. Светлые столбики — гомогенат; столбики с косой штриховкой — надосадоочная фракция; столбики с горизонтальной штриховкой — митохондриальная фракция. 1 — циклофосфан — гипергликемия — облучение; 2 — циклофосфан — облучение — гипергликемия; 3 — адриабластин — гипергликемия — облучение; 4 — адриабластин — облучение — гипергликемия. Звездочка — статистически достоверные изменения.

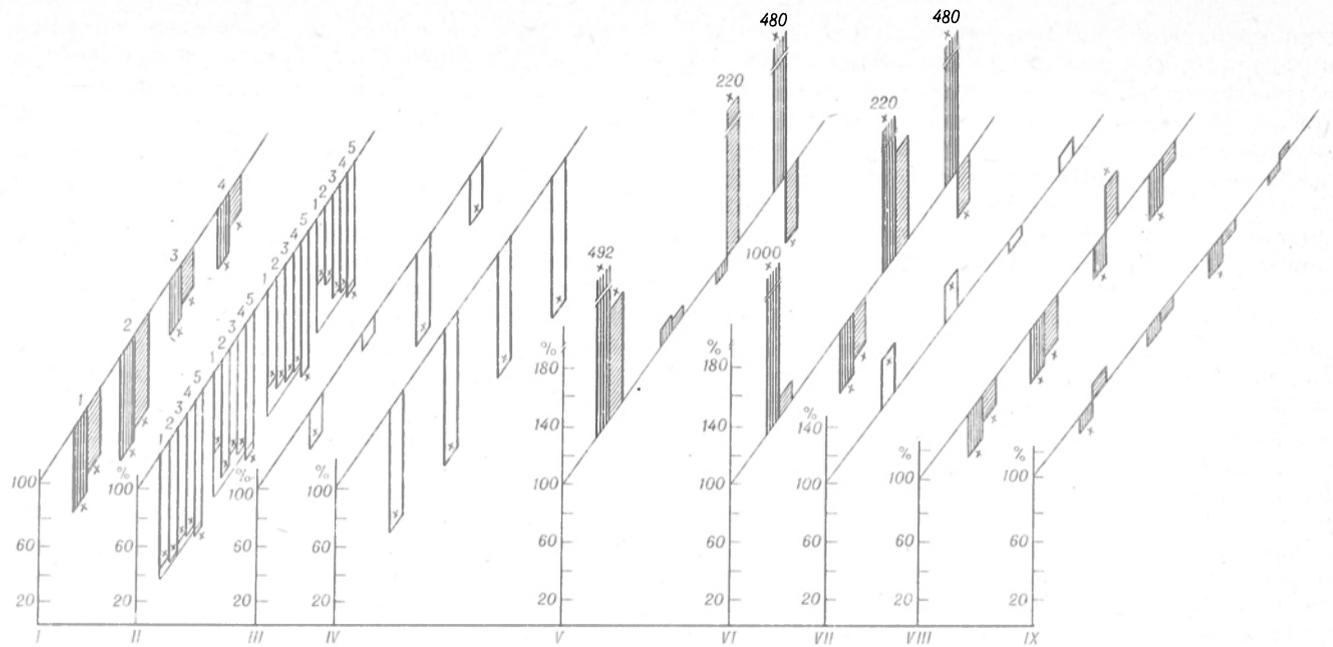


Рис. 2. Влияние химиотерапевтических веществ в сочетании с рентгеновским облучением и искусственной гипергликемией на активность ферментов и содержание субстратов в саркоме М-1.

Обозначения те же, что на рис. 1.

выражены изменения активности ГК при проведении гипергликемии и облучении в сочетании с циклофосфаном, а в карциносаркоме Уокера (рис. 3) — в сочетании с адриабластином.

Введение циклофосфана и адриабластина перед гипергликемией и рентгеновским облучением в любых сочетаниях снижает общую активность ЛДГ и всех ее изоферментов как в саркоме 45 (см. рис. 1), так и в саркоме М-1 (см. рис. 2), однако в первой из них эффекты циклофосфана более отчетливы, чем эффекты адриабластина. Изменения в содержании субстратов в этих опухолях имеют свои особенности. При проведении экспериментов с применением циклофосфана, облучения, гипергликемии в саркоме 45 отмечено

снижение концентрации пирувата на 87 %, а в саркоме М-1 — уменьшение лактата на 28 % и пирувата на 88 %. В комбинации с облучением после гипергликемии снижение содержания лактата в саркоме 45 выражено более отчетливо, чем в саркоме М-1. В комбинациях с адриабластином изменения концентрации лактата в саркомах 45 и М-1 аналогичны таковым, установленным с циклофосфаном, но в саркоме М-1 они более значимы. Содержание пирувата снижается на 80—89 % в обеих опухолях независимо от последовательности проведения нагрузки глюкозой и облучения. В карциносаркоме Уокера (см. рис. 3) циклофосфан в сочетании с рентгенотерапией и нагрузкой глюкозой в меньшей степени понижает

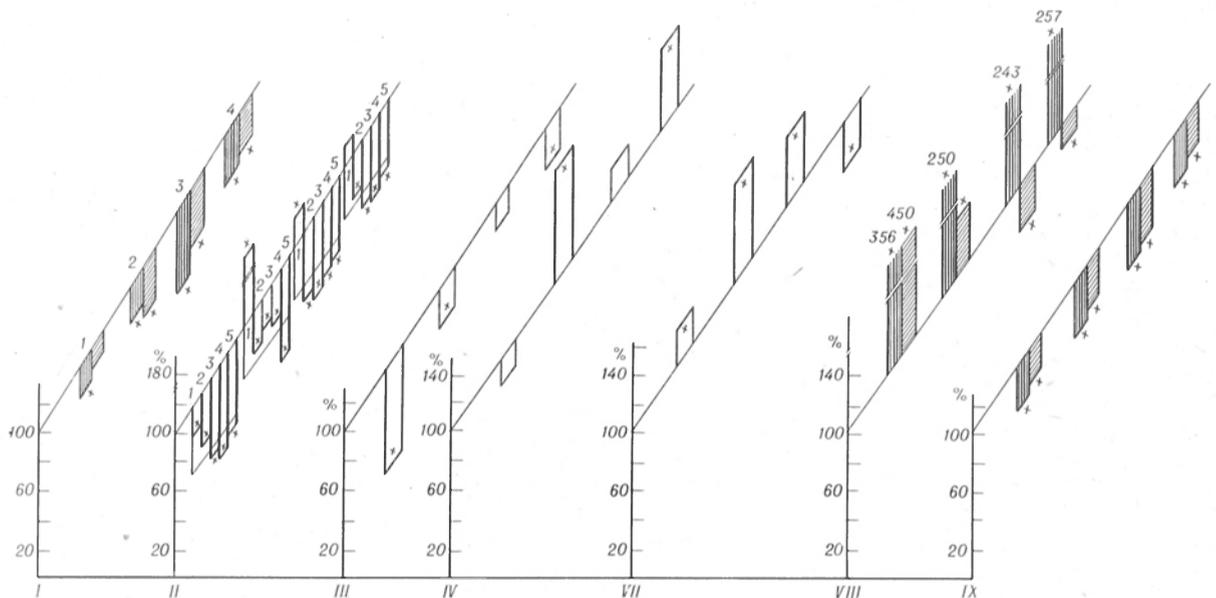


Рис. 3. Влияние химиотерапевтических веществ в сочетании с рентгеновским облучением и искусственной гипергликемией на активность ферментов и содержание субстратов в карциносаркоме Уокера 256.

Обозначения те же, что на рис. 1.

общую скорость реакций, катализируемых ЛДГ и ее изоферментами, особенно анаэробными, по сравнению с эффектами, установленными в саркомах 45 и М-1, а последовательность циклофосфан — облучение — гипергликемия повышает активность, аэробного изофермента ЛДГ-1 на 79 %. Эти изменения сочетаются с некоторым уменьшением в карциносаркоме Уокера содержания лактата, особенно при облучении на фоне введения глюкозы. Последовательность проведения облучения и гипергликемии после адриабластина в большей степени влияет на изменения содержания лактата и пирувата в саркомах 45 и М-1. В карциносаркоме Уокера содержание пировиноградной кислоты возрастает.

Из изложенного видно, что влияние рентгеновского облучения и больших доз глюкозы в сочетании с химиопрепаратами на исследуемые показатели начального и терминального этапов гликолиза зависит от вида опухоли, последовательности воздействий и особенностей противоопухолевой эффективности цитостатика. Эта же закономерность прослеживается и при анализе данных об активности окислительно-восстановительных ферментов СДГ и α -ОГДГ в субклеточных фракциях опухолей. В саркоме М-1 (см. рис. 2) при проведении облучения и гипергликемии на фоне введения циклофосфана отмечается тенденция к снижению окисления сукцината и α -оксоглутарата, в то же время облучение после введения циклофосфана и гипергликемии активизирует изучаемые процессы в субклеточных фракциях как саркомы 45 (см. рис. 1), так и саркомы М-1 (см. рис. 2). В супернатанте отмечается превышение контрольных величин в 3—10 раз, что указывает на деструктивные изменения в митохондриях. Комплексное воздействие, включающее введение адриабластина и последующие облучение и гипергликемию, ингибирует на 20—40 % активность СДГ и α -ОГДГ в обеих опухолях. При проведении воздействия в последовательности адриабластин — гипергликемия — облучение в саркоме М-1 наблюдается активация как СДГ, так и α -ОГДГ в 2,5—5 раз. В саркоме 45 прослеживается тенденция к снижению активности этих оксидоредуктаз.

Анализ данных, отражающих изменения активности Mg^{2+} -АТФазы в саркомах 45 (см. рис. 1) и М-1 (см. рис. 2), показал, что в случае применения последовательности цитостатик — глюкоза — облучение активность фермента повышается при введении циклофосфана и имеет тенденцию к снижению в случае применения адриабластина. Если же облучение предшествовало гипергликемии, то эффект был однонаправленным для обоих химиотерапевтических веществ и активность Mg^{2+} -АТФазы в опухолях увеличивалась, особенно в саркоме 45 при введении циклофосфана. В карциносаркоме Уокера наибольшая активация фермента отмечена также в серии с введением глюкозы на фоне облучения и действия циклофосфана. Замена его на адриабластин в той же последовательности снижает активность Mg^{2+} -АТФазы (см. рис. 3).

Сопоставление результатов исследований активности АлАТ в саркомах также показало зависимость изменений от вида опухоли и последовательности экспериментальных воздействий. В саркоме 45 (см. рис. 1) наиболее выраженное умень-

шение скорости реакции, катализируемой ферментом и особенно митохондриальным изоферментом, установлено при введении циклофосфана, облучении и гипергликемии, а при введении адриабластина оно не зависит от последующих комбинаций нагрузки глюкозой и радиации. Достоверное понижение содержания пиридоксальных коферментов в субклеточных фракциях саркомы 45 отмечено только в сериях с циклофосфаном. В саркоме М-1 (см. рис. 2) более значительно уменьшение активности обоих изоферментов АлАТ в комбинациях с циклофосфаном по сравнению с адриабластином, однако введение адриабластина снижает активность цитоплазматического изофермента. Количество пиридоксальных коферментов (ПАЛФ и ПАМФ) достоверно понижается в цитоплазме при введении адриабластина, гипергликемии, а затем при облучении. Наиболее интересен характер сдвигов активности АлАТ в карциносаркоме Уокера (см. рис. 3). Введение цитостатиков в сочетании с облучением и нагрузкой глюкозой приводит к увеличению скорости реакции, катализируемой цитоплазматическим изоферментом, в 2,5—3,5 раза во всех сериях опытов. В то же время в сериях с циклофосфаном активность митохондриального изофермента возрастает, а с адриабластином — понижается. Важно отметить, что эти изменения во всех случаях происходят на фоне обеднения субклеточных фракций опухоли пиридоксальными коферментами.

В результате изучения биохимических показателей обмена веществ в субклеточных фракциях сарком 45, М-1 и карциносаркомы Уокера при действии цитостатиков, гипергликемии и рентгеновского облучения в различных последовательностях и сопоставления установленных эффектов с данными, полученными по раздельному влиянию компонентов комбинаций [5—9], можно заключить, что введение больших доз глюкозы усиливает ряд эффектов химиотерапевтических веществ и рентгенотерапии. Это выражается в снижении интенсивности гликолиза, изменения скоростей окислительно-восстановительных реакций, приводящих к сдвигам соотношения между гликолизом и процессами биологического окисления в митохондриях. Установленные сдвиги активности АлАТ могут являться следствием нарушения интенсивности гликозилирования отдельных субформ изоферментов АлАТ.

Количественная и качественная оценка изменений показывает, что более чувствительной к воздействиям обоих цитостатиков в комплексе с рентгеновским облучением и нагрузкой глюкозой является саркома М-1, затем — карциносаркома Уокера. Сочетания с циклофосфаном в большей степени, чем с адриабластином, эффективны при саркоме 45. Проведенные исследования показали, что наиболее предпочтительными являются такие комбинации воздействий, при которых гипергликемия осуществляется после облучения. В этих условиях выраженное торможение гликолиза может способствовать угнетению энергообеспечения процессов роста опухоли и в дальнейшем ее регрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдонин П. В., Марченко М. П., Ткачук А. В. // Биохимия. — 1980. — Т. 49, № 11. — С. 1970—1979.

2. Александров П. Н., Савченко П. Е., Фрадкин С. З., Жаврид Э. А. Применение гипертермии и гипергликемии при лечении злокачественных опухолей.— М., 1980.
3. Горяченкова Е. В. // Биохимия.— 1963.— Т. 28, № 3.— С. 565—571.
4. Ковбасюк С. А. // Вопр. онкол.— 1985.— Т. 35, № 7.— С. 55—59.
5. Кукулянская М. Ф., Мохорева С. И., Орел Н. М. и др. // Актуальные проблемы медицины и биологии.— Киев, 1986.— С. 312—326.
6. Кукулянская М. Ф., Орел Н. М., Пикулев А. Т., Хрипченко И. П. // Научно-технический прогресс в медицине и биологии.— Киев, 1987.— № Т. 1.— С. 186—205.
7. Кукулянская М. Ф., Хрипченко И. П., Вальштейн М. М. и др. // Радиобиология.— 1988.— Т. 23, № 3.— С. 371—375.
8. Кукулянская М. Ф., Хрипченко И. П., Корженевская Т. М. // Вести. Белорусск. ун-та. Сер. 2.— 1988.— № 3.— С. 27—30.
9. Орел Н. М., Мохорева С. И., Пикулев А. Т. // Актуальные проблемы медицины и биологии.— Киев, 1988.— Т. 1.— С. 376—380.
10. Пелевина Н. И., Афанасьев Г. Г., Готлиев В. Я. Клеточные факторы реакции опухолей на облучение и химиотерапевтические воздействия.— М., 1978.
11. Пикулев А. Т., Орел Н. М. // Вести. Белорусск. ун-та. Сер. 2.— 1980.— № 1.— С. 47—48.
12. Пикулев А. Т., Щербань А. И. // Вопр. мед. химии.— 1980.— № 5.— С. 671—673.
13. Рокцкий П. Ф. Биологическая статистика.— Минск, 1974.
14. Чернов В. А. Методы экспериментальной химиотерапии: Практическое руководство.— М., 1971.
15. Шеклик Э. Клиническая ферментология.— Варшава, 1966.
16. Everse A., Kaplan N. O. // Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology.— San Francisco, 1973.— Vol. 11.— P. 61—65.
17. Long C. // Biochem. J.— 1951.— Vol. 49.— P. 34—37.
18. Nordman J., Nordman R., Ganchery O. // Bull. Soc. Chem. Biol.— 1951.— Vol. 33, N 11—12.— P. 1829—1836.
19. Rathbun N., Betlach K. // Analyt. Biochem.— 1969.— Vol. 28.— P. 436—445.
20. Samoji O., Fonie A., Vince O. // Acta physiol.— 1962.— Vol. 21.— P. 295—300.
21. Weoblesky F., La Due J. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.).— 1956.— Vol. 91.— P. 569—574.

Поступила 20.02.91

SIMULTANEOUS EFFECT OF HUPERGLYCEMIA, CHEMO- AND X-RAY THERAPY ON METABOLISM OF SOME RAT SARCOMAS

A. T. Pikulev, N. M. Orel, M. F. Kukulyanskaya, S. I. Mikhoreva, M. M. Filimonov, I. P. Khrichenko, V. M. Chernoguzov
Belorussian State University, Minsk

A number of metabolic parameters were studied in subcellular fractions of rat sarcoma 45, M-1 and carcinosarcoma Worker 256. Administration of high doses of glucose amplified some effects of chemotherapeutic drugs and X-ray therapy, which were manifested as follows: a decrease in glycolysis rate, alteration in the rate of redox reactions, shifts in the ratio between glycolysis and biological oxidation in mitochondria. These alterations were determined by the type of sarcoma, by sequence of operations in the procedure and by cytostatic used. The most effective procedure proved to be simultaneous administration of drugs and X-ray therapy followed by hyperglycemia. Distinct inhibition of glycolysis detected under these conditions may contribute to inhibition of energy metabolism during the sarcoma growth and regression.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 615.214.31.017:615.243].036:616.33-002.44].076.9

Г. Е. Самонина, Н. А. Нацвлишвили,
И. П. Ашмарин

АНТИУЛЬЦЕРОГЕННОЕ (ЛЕЧЕБНОЕ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ) СВОЙСТВО ОДНОГО ИЗ ПСИХОСТИМУЛЯТОРОВ ФЕНИЛАЛКИЛСИДНОНИМИНОВОГО РЯДА

Кафедра физиологии человека и животных биологического факультета Московского университета им. М. В. Ломоносова

Язва желудка является заболеванием, возникновение которого связано как с центральными, так и с периферическими механизмами [9]. Вполне понятно, что наиболее оптимальными фармакологическими антиульцерогенными препаратами должны быть препараты, точка приложения которых, с одной стороны, связана с центральной нервной системой, а с другой — с периферическими структурами.

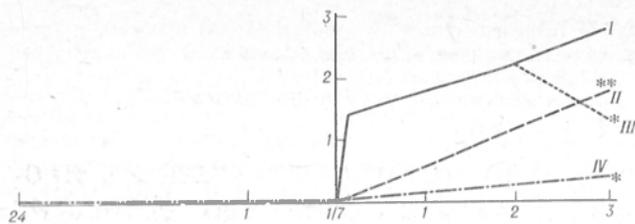
В последнее время выявлено, что некоторые психостимуляторы и антидепрессанты наряду с психостимулирующей (центральной) активностью обладают еще и периферическим свойством [4, 5, 8].

Нами показано, что один из психостимуляторов фенилалкилсиднониминного ряда ОФ 743 в значительной степени предотвращает развитие экспериментально вызванных стрессорных и этаноловых язвенных повреждений слизистой оболочки желудка крыс [7]. Протекторное противоязвенное действие ОФ 743 проявляется при широком спектре доз, наименьшие из которых на 2—3 порядка ниже доз, обычно используемых для психостимуляции.

Однако протекторное (профилактическое) действие не обязательно связано с лечебными свойствами препаратов. В связи с этим представлялось необходимым выяснить, оказывают ли ОФ 743 влияние на уже сформировавшиеся язвенные поражения слизистой оболочки желудка, т. е. можно ли говорить об ОФ 743 как о препарате, обладающем и лечебными свойствами.

Методика. На двух параллельных группах беспородных крыс массой около 200 г вызывали этаноловые повреждения слизистой оболочки желудка введением в его полость через специальный катетер 1 мл 96° этанола [10], а затем через 8 мин или через 2 ч после его введения внутримышечно вводили 15 мг/кг ОФ 743 (экспериментальным группам); контрольной группе вводили физиологический раствор в объеме, равном вводимому объему ОФ 743 (0,2 мл). В специальной серии опытов этанол вводили на фоне действия ОФ 743, который инъектировали за 24 и 1 ч до введения этанола. В каждой серии было проведено по 5 опытов; в каждом опыте было по 4—5 контрольных и экспериментальных крыс.

Через 3 ч после введения этанола животных, наркотизированных нембуталом (30 мг/кг), забивали, извлекали желудки и под бинокулярной лупой определяли общую длину (в миллиметрах) поражения слизистой оболочки желудка. Тяжесть поражения рассчитывали в баллах, исходя из 3-балльной системы: отсутствие повреждений — 0 баллов; гиперемия или небольшая длина повреждений (1—16 мм) — 0,5 балла; длина повреждений в 17—33, 34—50, 51—67, 68—84, 85 мм и более оценивалась соответственно в 1, 1,5, 2, 2,5 и 3 балла. С целью исследования величины развития этаноловых поражений в одной из серий крыс забивали и исследовали желудки через 8 мин и 2 ч после введения этанола. Животным этой группы ОФ 743 не вводили. Результаты обрабатывали с применением непараметрических критериев вариационной статистики [1, 2].



Профилактическое и лечебное противоязвенное действие препарата ОФ 743.

По оси абсцисс — время (в ч) до (минус) и после введения этанола в желудок крыс; по оси ординат — тяжесть поражения (ТП), баллы. Расположение оси ординат соответствует моменту введения этанола. I — контроль; II и III — введение ОФ 743 через 8 мин и 2 ч после этанола соответственно; IV — инъекция препарата за 24 и 1 ч до введения этанола. Одна звездочка — $p < 0,001$; две — $p < 0,005$ по сравнению с контролем.

Результаты и обсуждение. Введение в желудок крыс 1 мл этанола вызывало через 3 ч развитие значительных повреждений слизистой оболочки желудка, оцениваемой в среднем в 2,6 балла. Повреждения развивались у всех 44 животных без исключения. Развитие поражения слизистой оболочки происходило сразу же после введения этанола, и уже через 8 мин тяжесть поражения в среднем была равна 1,4 балла, увеличиваясь через 2 ч до 2,2 балла (см. рисунок, сплошная линия). К 4-му часу происходит уменьшение язвенных этаноловых поражений (на рисунке не показано). Практически одновременное введение этанола и ОФ 743 (последний инъецировали через 8 мин после этанола) через 3 ч сопровождалось уменьшением тяжести поражения по сравнению с контролем ($p < 0,005$).

Введение ОФ 743 через 2 ч после этанола сопровождалось еще более значительным уменьшением повреждения слизистой оболочки (см. рисунок; $p < 0,001$). Если в контроле наименьшие повреждения слизистой оболочки (0,5 балла) выявлены только у 1 из 44 крыс, то при введении ОФ 743 у 18% животных (у 3 из 17 крыс) повреждения отсутствовали полностью, а у 4 не превышали 0,5 балла. В данном случае четко проявлялся лечебный эффект препарата.

Сопоставление антиульцерогенного действия ОФ 743 при введении его на фоне этанола (т. е. на фоне уже развившихся повреждений слизистой оболочки) с его антиульцерогенным действием, когда язвообразование осуществляется на фоне ОФ 743 (т. е. когда препарат вводили до этанола), выявило еще меньшее повреждение желудка (см. рисунок). Число крыс, у которых отсутствуют этаноловые повреждения, увеличилось (до 47%; 14 крыс из 30).

С какими механизмами связано действие ОФ 743? При изучении данной модели язвообразования трудно говорить о сколько-нибудь значимой роли центрального механизма [7]. Скорее всего, оно обусловлено уменьшением секреции кислоты в результате холинолитической активности ОФ 743. Не исключено, что антиульцерогенный эффект ОФ 743 связан и с увеличением кровотока в слизистой оболочке [3, 13], резко уменьшенным этанолом [11, 12]. Последнее предположение основано на фактах, свидетельствующих, что некоторые препараты сиднониминового ряда являются вазодилататорами, например сиднофарм [6].

Таким образом, кроме описанного ранее про-

текторного (профилактического) противоязвенного действия, препарат ОФ 743 обладает и лечебной эффективностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П., Васильев Н. П., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирования экспериментов.— Л., 1975.
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев вариационной статистики в медико-биологических исследованиях.— М., 1973.
3. Ивашкин В. Т., Дорофеев Г. И. // Сов. мед.— 1983.— № 2.— С. 10—15.
4. Мандрико Е. В. Новые модуляторы парасимпатической регуляции ритма сердца. Сиднофен — активный ваголитик: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1990.
5. Мандрико Е. В., Паршин В. А., Самонина Г. Е. // Хим.-фарм. журн.— 1989.— № 10.— С. 1173—1175.
6. Машковский М. Д. Лекарственные средства.— М., 1987.— Т. 1.— С. 445.
7. Нацвлишвили Н. А., Самонина Г. Е., Ашмарин И. П. // Бюл. exper. биол.— 1991.— № 12.
8. Самонина Г. Е., Мандрико Е. В. // Там же.— 1989.— № 4.— С. 449—451.
9. Фишзон-Рысс Ю. И., Рысс Е. С. Гастродуоденальные язвы.— М., 1989.
10. Derclanko M., Long I. // Proc. Soc. exp. Biol. Med.— 1981.— Vol. 166, N 3.— P. 394—397.
11. Olbe L., Lundell L. // Contemp. Issues Gastroent.— 1985.— Vol. 3.— P. 151—180.
12. Tarnawski A., Hollander D., Stachura J. et al. // Gastroenterology.— 1989.— Vol. 88, N 1.— Pt 2.— P. 334—352.
13. Tepperman B. L., Jacobson E. D. // Contemp. Issues Gastroent.— 1985.— Vol. 3.— P. 261—278.

Поступила 18.02.91

ANTIULCEROGENIC, CURATIVE AND PROTECTIVE, EFFECTS OF ONE OF PSYCHOSTIMULATORS FROM PHENYLALKYL SYDNONIMINE SERIES

G. E. Samonina, N. A. Natsvlishvili, I. P. Ashmarin
M. V. Lomonosov State University, Moscow

Intragastric administration of 96% ethanol, 1 ml/100 g of body mass, induced ulcerous impairments of rat gastric mucosal membrane, which were marked within 8 min after ethanol administration and reached the maximal size within 3 hrs. Psychostimulator of the phenylalkyl sydnonimine series OF 743, administered after the ethanol treatment, decreased distinctly the ethanol-induced impairments of gastric mucosal membrane and this effect was higher in simultaneous inoculation of the drug and ethanol. The data obtained suggest that preparation OF 743 exhibited both protective and curative antiulcerogenic efficiency.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616-006.81-018.1:576.351-02-[615.357:547.96]-092.4

В. А. Суханов, Л. Ф. Морозова, В. В. Лалаев,
А. В. Яхъяев, В. Л. Дьяков

ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ МЕЛАНОМНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА MS И BRO α -МЕЛАНОЦИТСТИМУЛИРУЮЩИМ ГОРМОНОМ

Всесоюзный научный центр молекулярной диагностики и лечения Минздрава СССР, Москва

Пептиды в качестве гормонов и ростовых факторов могут являться важными регуляторами физиологических процессов, протекающих в опухолевых клетках. Во многих случаях роль пептидных

гормонов неясна. Так, недостаточно изучены механизмы регуляции меланогенеза и роста клеток злокачественных меланом человека под действием α -меланоцитстимулирующего гормона (α -МСГ).

В связи с этим в настоящем исследовании нами изучены влияние α -МСГ на пролиферацию двух злокачественных меланомных линий человека, различающихся фенотипически по активности тирозиназы и способности образовывать меланин — BRO (тирозиназа отсутствует) и MS (высокая активность тирозиназы), а также лиганд-рецепторные взаимодействия гормона с этими клетками.

Методика. Культура клеток злокачественной меланомы человека BRO была любезно предоставлена проф. А. Локшиным, а клетки злокачественной меланомы человека MS взяты из банка клеток ВОИЦ АМН СССР. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 или L-15 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, инактивированной при 56 °С 30 мин, с 2 мМ глютамина, пенициллина (100 ЕД/мл) и стрептомицина (100 мг/мл) при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Монослой клеток выращивали в пластиковых матрасах площадью 25 см². α -МСГ добавляли со средой в различных концентрациях. Пролиферативную активность клеток оценивали по их способности включать ³H-тимидин [1].

В работе использовали следующие реактивы и препараты: α -МСГ («Reanal», Венгрия); акриламид; N,N'-метилен-бисакриламид, бычий сывороточный альбумин («Serva», ФРГ); апротинин («Sigma», США); фенилметилсульфонилфторид («Fluka», Швейцария); Na¹²⁵I отечественного производства с удельной активностью 2000 Ки/ммоль. Все остальные реактивы и компоненты буферных растворов были марки х. ч. или ч. д. а. и использовались без предварительной очистки.

¹²⁵I- α -МСГ получали по стандартной методике [3], используя Iodo-Beads («Pierce», Англия) и двукратный молярный избыток α -МСГ по отношению к Na¹²⁵I. Чистоту полученного меченого препарата определяли по методу [6] с использованием колонки «UltrasphereTM-ODS», 4,6×250 мм («Altex», США) и 3-ступенчатого градиента: 0—5 мин, буфер А [0,1 % трифторуксусная кислота в 0,1 М (NH₄)₂ SO₄]; 5—10 мин, 0—25 % буфера Б (0,1 % трифторуксусная кислота в 80 % водном ацетонитриле) и 10—70 мин, 25—50 % буфера Б при скорости элюции 1 мл/мин, λ —206 нм и pH 2,8—3,0.

Связывание ¹²⁵I- α -МСГ с клеточными культурами. Клетки (5·10⁵—10⁶) отмывали бесывороточным изотоническим буфером и инкубировали при 4 °С или 37 °С в течение 2 ч с ¹²⁵I- α -МСГ (0,7—60 нМ) в фосфатном изотоническом буфере pH 7,2, содержащим 1 % альбумин, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид и апротинин (2,9 мкг/мл). Специфическое связывание с клетками вычислено по разности числа радиоактивных распадов в минуту в отсутствие и присутствии «холодного» α -МСГ (1000—10 000-кратный молярный избыток по отношению к ¹²⁵I- α -МСГ). Отмывку клеток от свободной метки проводили либо вручную (5 циклов суспендирования клеток в изотоническом растворе с последующим удалением супернатанта при 4 °С), либо в автоматическом режиме на приборе «Harvester-530» («Flow», Англия) по стандартной методике. Радиоактивность в клетках определяли с помощью счетчика «Minigramma» (LKB, Швеция). Специфическое связывание определяли из 6 параллельных опытов. При вычислении средней арифметической явно отклоняющиеся значения не учитывали. При проведении экспериментов по связыванию с меткой при 37 °С для учета возможной интернализации при этой температуре ¹²⁵I- α -МСГ в клетку определяли остаточную радиоактивность клеток после 5-минутной инкубации последних в 0,04 М натрий-ацетатном буфере pH 4,5, содержащим 0,9 % NaCl и 0,1 % бычий сывороточный альбумин.

Метод определения внутриклеточного распределения α -МСГ после эндоцитоза. 3·10⁷ клеток линий BRO или MS переводили в бесывороточную среду и после инкубации в течение 1 ч при 37 °С охлаждали до 4 °С и суспендировали в 5 мл 0,02 М фосфатного буфера pH 7,2, содержащего 0,13 М NaCl, 1 % бычий сывороточный альбумин и 7,5·10⁻⁹ М ¹²⁵I- α -МСГ. После 1,5-часовой инкубации при 4 °С и последующей отмывки от свободной метки клетки в течение 8 мин инкубировали в изотоническом фосфатном буфере при 37 °С. Осадок клеток после центрифугирования гомогенизировали при 4 °С в 3 мл 0,01 М трис-HCl-буфере pH 7,5 в гомогенизаторе Даунса с плотно притертым пестиком, совершая не менее 100 ходов для более полного разрушения клеток. Гомогенат после 10-минутной инкубации подвергали 3-ступенчатому центрифугированию при 500 g (отделение ядер и оставшихся интактных клеток),

9000 g (отделение лизосом и митохондрий) и 105 000 g (отделение микросомальной фракции от цитозоля). В каждой фракции определяли радиоактивность.

Выделение цитозольного рецептора α -МСГ. Выделение тройного комплекса α -МСГ-рецептор-полирибосомальный комплекс с м-РНК рецептора проводили по методу, описанному в работе [4] для рецепторов ростовых факторов с некоторыми модификациями. 15·10⁶ клеток линии BRO гомогенизировали в 5 мл 0,02 М трис-HCl буфера pH 7,6 содержащего 1 мМ ЭДТА. После двухступенчатого центрифугирования при 800 g (отделение интактных клеток, ядер и митохондрий) и 105 000 g (отделение микросом) отбирали цитозольную фракцию и к ней добавляли ¹²⁵I- α -МСГ до концентрации в реакционной смеси 4,5·10⁻⁹ М. Инкубацию проводили при 25 °С в течение 10 мин и при 4 °С в течение 2 ч. Тройной комплекс осаждали центрифугированием при 105 000 g в течение 60 мин и далее анализировали с помощью электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия по методу [2] с последующей автордиографией.

Результаты и обсуждение. При изучении влияния α -МСГ на процесс меланогенеза клеток злокачественной меланомы человека BRO и MS нами было замечено, что этот пептид оказывает прежде всего воздействие на пролиферацию меланомных клеток (рис. 1). Этот эффект был неодинаков для фенотипически различающихся меланомных линий. Эффективные цитотоксические концентрации α -МСГ (IC₅₀) составляли 2·10⁻⁸ М для клеток MS и около 10⁻⁶ М для линии BRO. При концентрациях порядка 10⁻⁹ М α -МСГ активировал рост клеток BRO и ингибировал пролиферацию линии MS. Вместе с тем наблюдалось заметное изменение морфологии клеток. Это хорошо прослеживалось при фазово-контрастной и УФ-микроскопии фиксированных препаратов, окрашенных конканавалином А (КонА), меченным препаратом ФИТЦ.

На рис. 2, 3 представлены фрагменты монослой культуры клеток MS и BRO, полученные при ультрафиолетовом освещении. В контрольных препаратах клетки округлой и вытянутой формы, имеющие ядра с выраженными нуклеолами. Красящее вещество равномерно распределялось в цитоплазме, ядра имели четкие контуры. Эффект воздействия α -МСГ наблюдали уже после 30 мин инкубации клеток в присутствии гормона. Клетки принимали округлую форму, красящее вещество распределялось преимущественно в области ядер, границы которых становились нечеткими. После 24 ч инкубации клеток с α -МСГ наблюдали заметное изменение их морфологии. Клетки принимали амевидную форму с многочисленными выростами цитоплазмы, а красящее вещество кон-

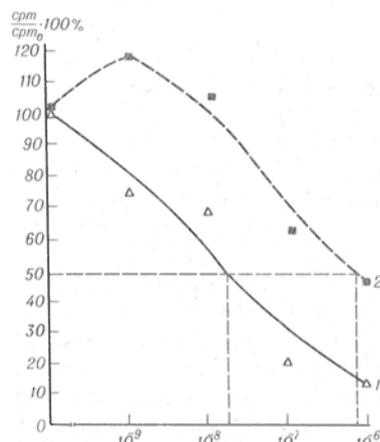


Рис. 1. Влияние α -МСГ на рост клеток злокачественной меланомы человека MS (1) и BRO (2).

Сравнение с контролем проведено на 7-е сутки. По оси абсцисс — концентрация α -МСГ, по оси ординат — соотношение (%), по оси ординат — соотношение (%). В пробах (он/контр.).

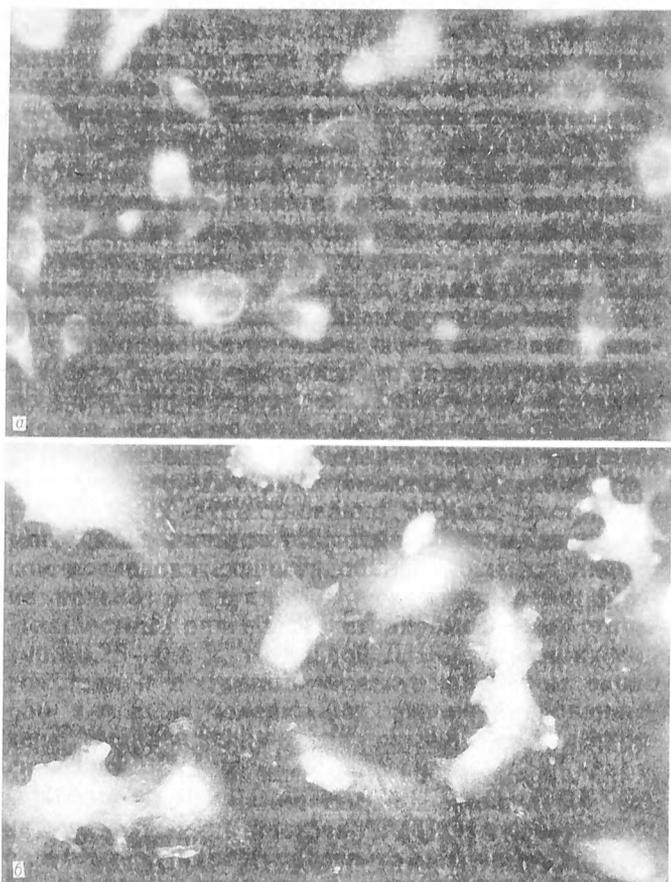


Рис. 2. Морфология меланомных клеток MS при их нормальном росте (а) и через 24 ч после воздействия α -МСГ ($2 \cdot 10^{-7}$ М) (б). Здесь и на рис. 3: УФ-микроскопия ФИТЦ-КонА-окрашенных препаратов. Ув. 400.

центрировалось преимущественно в ядрах (см. рис. 2). Максимальный эффект наблюдали на 3-и сутки (см. рис. 3). Клетки отличались сильно выраженным полиморфизмом. Появлялись гигантские клетки с выростами цитоплазмы в виде дендритов. Таким образом, α -МСГ ингибировал рост клеток с изменением их морфологии. Естественно было предположить, что этот эффект обусловлен особенностями эндокринной регуляции роста клеток MS и BRO при прохождении гормонального сигнала на уровне внутриклеточных событий. В связи с этим нами была предпринята попытка изучения связывания α -МСГ с поверхностью клеток и выяснения возможной корреляции этого процесса с наблюдаемыми физиологическими процессами. Для этого был синтезирован радиоактивно меченый гормон ^{125}I - α -МСГ с удельной активностью $3,9 \cdot 10^8$ расп/мин · моль и чистотой по радиоактивности более 90 %. В первую очередь было исследовано взаимодействие меченого гормона с клетками линий BRO и MS при 4 °С, когда полностью исключена возможность включения лиганда в клетку в результате эндоцитоза. На рис. 4 и 5 представлены полученные нами данные по связыванию гормона с клетками при 4 °С. Из этих данных следует однозначный вывод: при 4 °С специфическое связывание радиолганда с поверхностью клеток линий MS и BRO не наблюдается. Разность между включением метки в клетки в присутствии и в отсутствие «холодного» гормона была незначительной и не превышала средних величин отклонений при повторных измерениях.

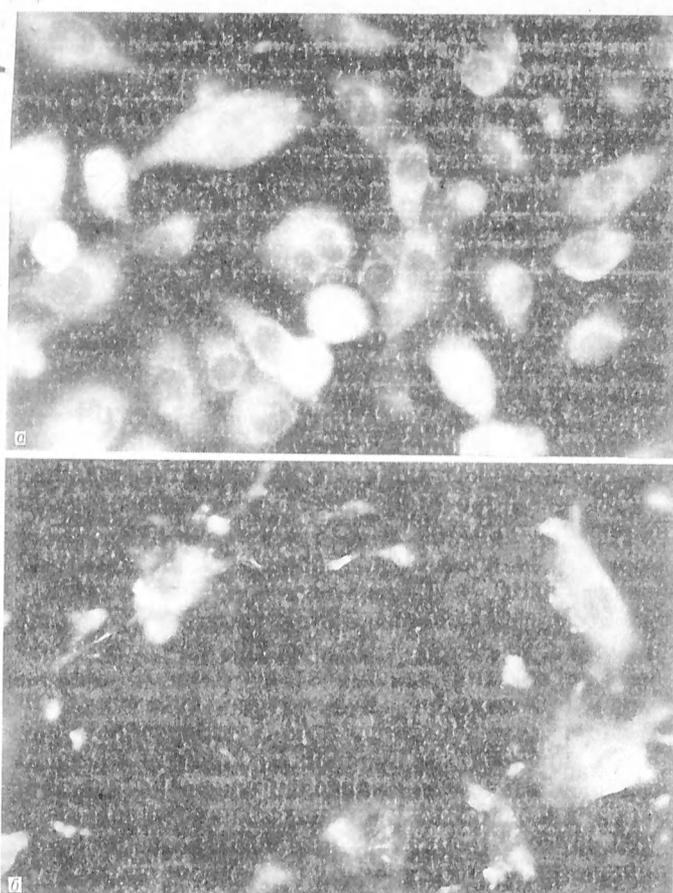


Рис. 3. Морфология меланомных клеток BRO при их нормальном росте (а) и на 3-и сутки после воздействия α -МСГ ($2 \cdot 10^{-7}$ М) (б).

Таким образом, при 4 °С лиганд-рецепторные взаимодействия на поверхности плазматических мембран клеток этих линий обнаружить не удастся, что согласуется с аналогичными данными для клеток других меланомных линий [5]. В связи с этим была предпринята попытка обнаружить связывание плазматических мембран клеток с радиолгангом при физиологической температуре (37 °С). В специальном эксперименте были определены протеолитическая активность клеток линии MS и ее влияние на устойчивость меченого α -МСГ при 37 °С. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (см. раздел «Методика») показано, что при 1,5—2-часовой инкубации ^{125}I - α -МСГ с клетками линии MS при 37 °С в присут-

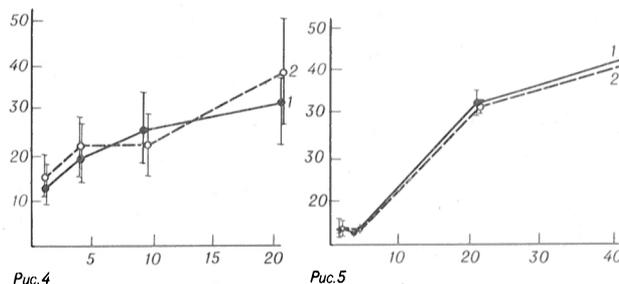


Рис. 4. Связывание ^{125}I - α -МСГ с меланомной клеточной линией BRO при 4 °С.

Здесь и на рис. 5: 1 — без «холодной» метки; 2 — в присутствии «холодной» метки. Количество клеток в одном опыте 10^4 . По оси абсцисс — концентрация ^{125}I - α -МСГ, $\text{M} \cdot 10^{-3}$; по оси ординат — имп/мин $\cdot 10^{-4}$.

Рис. 5. Связывание ^{125}I - α -МСГ с клетками линии MS при 4 °С

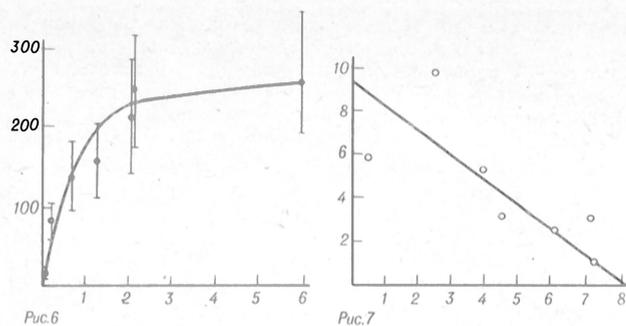


Рис. 6. Кривая насыщения специфических рецепторов клеток MS в зависимости от концентрации α -МСГ при 37 °С.

Количество клеток в одном опыте 10^6 . По оси абсцисс — концентрация свободного α -МСГ, $M \cdot 10^{-9}$; по оси ординат имп/мин.

Рис. 7. Специфическое связывание ^{125}I - α -МСГ с меланомными клетками линии MS при 37 °С в координатах Скэтчарда.

По оси абсцисс — концентрация связанного α -МСГ, $M \cdot 10^{-12}$; по оси ординат — соотношение $(M \cdot 10^{-9})$ концентраций связанного и свободного α -МСГ.

ствии 2 ингибиторов протеазной активности — фенилметилсульфонилфторида и апротинина — существенного гидролиза меченого соединения не наблюдается.

Осложнением при изучении связывания лиганда с клетками при 37 °С может также явиться эндоцитоз, который существенно усложняет интерпретацию получаемых результатов. В связи с этим для оценки количества попавшего в клетку в результате эндоцитоза меченого гормона после инкубации производили обработку клеток при 4 °С кислым натрий-ацетатным буфером, вызывающим диссоциацию лиганд-рецепторных комплексов на поверхности плазматических мембран. Было установлено, что даже 5-минутная обработка кислым буфером вызывает практически полное (более 90 %) удаление специфически связанного с клетками ^{125}I - α -МСГ, т. е. эндоцитоз в условиях эксперимента существенного изменения в получаемые результаты по специфическому связыванию при этой температуре внести не может. На рис. 6 и 7 представлены данные по специфическому связыванию метки с клетками линии MS, изображенные в стандартных координатах насыщения (рис. 6) и координатах Скэтчарда (рис. 7). В результате интерпретации графических данных установлено, что константа диссоциации лиганд-рецепторного комплекса составляет $9,1 \pm 3,1$ нМ, а число мест связывания лигандов с клеткой V_{\max} — примерно 85 ± 20 . Таким образом, на плазматической мембране клеток существуют высокоспецифические рецепторы к α -МСГ. Количество рецепторов на поверхности клеток линии MS значительно ниже их количества, определенного для других меланомных линий человека, где V_{\max} более 1000 [5]. В связи с этим, вероятно, мы не наблюдали внутриклеточного включения метки при 37 °С в опытах с использованием от $6 \cdot 10^5$ до 10^6 клеток.

Нами были поставлены специальные опыты по связыванию клеток с меченым гормоном в условиях интернализации с использованием большего количества клеток обеих линий. В таблице представлены полученные нами данные по внутриклеточному распределению гормона в органеллах линий BRO и MS, предварительно меченных ^{125}I - α -МСГ и в дальнейшем после инкубации в условиях эндоцитоза подвергнутых фракционированию. Как видно из представленных в таблице

Распределение (в %) ^{125}I - α -МСГ в органеллах клеток линий BRO и MS, меченных гормоном, после гомогенизации в гипотоническом буфере и при наличии в пробах в среднем $30 \cdot 10^6$ клеток

Линия	Ядра, остатки клеток	Митохондрии и лизосомы	Цитозоль	Микросомы	Всего, расп/мин
BRO	53,5	5,7	38,8	1,95	1690
MS	63,8	2,14	33,2	0,81	1468

данных, в результате эндоцитоза с органеллами клетки связывается незначительное количество меченого гормона (примерно 1500 расп/мин на 30 млн клеток, что соответствует проникновению внутрь одной клетки 7—8 молекул радиолиганда). Основная часть гормона внутри клетки сосредотачивается в цитозольной и ядерной фракциях. Представлялось важным выделить внутриклеточные рецепторы α -МСГ. С этой целью был использован наиболее чувствительный метод, заключающийся в осаждении рецепторов и их лигандов в виде полирибосомального комплекса с м-РНК. Этот метод был успешно применен при выявлении рецепторов ростовых факторов [4]. Осаждением комплекса ультрацентрифугированием получают невидимый глазом осадок, который после растворения в буфере, содержащем додецилсульфат натрия, и электрофореза по методу [2] с последующим окрашиванием геля серебром дает двойную полосу с мол. м. 50 и 58 кДа. Авторадиография указанного геля после его высушивания выявляет эти же две полосы и наряду с ними небольшого слабо выраженные полосы в высокомолекулярной области (150—200 кДа) (рис. 8). Чтобы убедиться в том, что выявляемые полосы относятся к рецептору α -МСГ, был проведен опыт в присутствии «холодного» α -МСГ. Как видно на рис. 8, немеченый α -МСГ в значительной степени ослабляет полосу, выявляемую при авторадиографии, что подтверждает специфичность связывания.

Наличие рецепторов α -МСГ у меланомных клеток и их физико-химические характеристики могут определять пути дальнейшей внутриклеточной передачи сигнала.

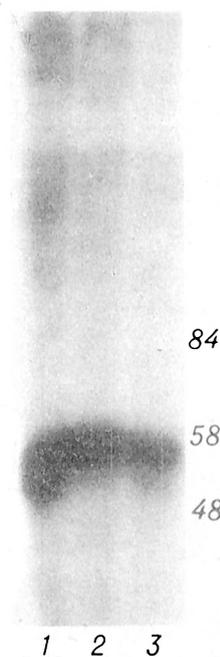


Рис. 8. Авторадиография ^{125}I - α -МСГ-рецепторного комплекса цитозольной фракции клеток линии BRO.

1 — без «холодного» α -МСГ; 2, 3 — в присутствии 10^{-2} - и 10^{-1} -кратного молярного избытка «холодной» метки соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Культура животных клеток: Методы / Под ред. Р. Френши. — М., 1989.
2. Laemly U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
3. Markwell M. A. K. // Analyt. Biochem. — 1983. — Vol. 125. — P. 427—432.
4. Rakowicz-Szulizynska E. M., Linnenbach A., Koprowski H. // J. Immunol. Meth. — 1989. — Vol. 116. — P. 167—173.
5. Siegrist W., Solca F., Stutz S. et al. // Cancer Res. — 1989. — Vol. 49. — P. 6352—6358.
6. Snider R. H., Moore C. F., Nylen E. S., Becker K. L. // Horm. Metabol. Res. — 1988. — Vol. 20. — P. 254—255.

Поступила 19.02.91

INHIBITION OF HUMAN MELANOMA CELLS MS AND BRO PROLIFERATION BY MEANS OF α -MELANOCYTE STIMULATING HORMONE

V. A. Sukhanov, L. F. Morozova, V. V. Lalaeu, A. V. Yakhyaev, V. L. D'yakov

All-Union Research Centre of Molecular Diagnostics, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Effect of α -melanocyte stimulating hormone (MSH) on proliferating activity of MS and BRO melanoma cell strains with dissimilar phenotype was studied. MSH, apart from the effect on melanomagenesis, influenced the cell proliferation. Growth of MS cells was inhibited at 10^{-8} – 10^{-9} M concentrations of the hormone ($IC_{50}=2 \cdot 10^{-8}$ M), while BRO cells were activated. The higher concentrations of MSH inhibited also BRO cells growth ($IC_{50}=9 \cdot 10^{-7}$ M). Ligand-receptor interaction of ^{125}I -MSH with plasmatic membranes and cytosol fraction of the cells was studied at 4° and 37°.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 576.385.5.04:547.415.5

С. П. Сяткин, Т. Т. Березов, Н. Я. Гридина, Л. С. Бундюк, Я. Ф. Ковалишин

ПОЛИАМИНЫ КАК БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПОЛИАМИНОВ И ПУТРЕСЦИНА В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ L-КЛЕТОК

Университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, Институт проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР, Киев

Наличие высокого положительного коэффициента корреляции, характеризующего связь между ростом опухолевых клеток и содержанием полиаминов (ПА) в тканях организма человека и животного, позволило рассматривать концентрацию спермидина (СД) и спермина (СМ) в крови как удобный биохимический показатель комплексной диагностики и эффективности химиотерапии [1]. Ингибиторы орнитиндекарбоксилазы и аденозилметиониндекарбоксилазы, такие, как DL- α -дифторметилорнитин (ДФМО) и метилгликоальбис-(гуанилгидразон) (МГБГ), снижают скорость клеточной пролиферации [5]. Однако исследование уровня ПА в опухолевых клетках в процессе роста в культуре ткани не проводили. Это определило цель данной работы, заключающейся в выяснении роли ПА в реализации антипролиферативного действия ДФМО и МГБГ.

Методика. Исследовали влияние ингибиторов полиаминсинтезирующих ферментов на скорость роста трансформиро-

ванных фибробластов мышей линии СЗП и на содержание в этих клетках ПА. Количественное определение путресцина (ПУТ) и ПА проводили методом внешних стандартов путем высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) даисильных производных этих веществ.

ВЭЖХ проводили на хроматографе APC/GPC-204 («Waters-millipore», США) с флуоресцентным детектором типа 420 при длине волны возбуждения 365 нм и эмиссии 495. Использовали хроматографическую колонку типа μ Bondapak C₁₈ (3,9×300 мм) с предколонкой 3,9×20 мм. Хроматографировали в течение 10 мин в линейном градиенте метанола (75—95%). Анализируемый образец вносили в 50 мкл, и разделение длилось 20 мин. Для количественной оценки содержания аминов пользовались методом внешних стандартов. Даисилирование лиофилизированных образцов препарата ткани и аликвот стандартных растворов ПУТ, СД и СМ осуществляли путем растворения в 200 мкл 0,2 М бикарбоната натрия, смешивания с равным объемом раствора даисилхлорида в ацетоне (5 мг/мл) и инкубирования в течение 12—16 ч в темноте при комнатной температуре. Далее инкубационную смесь пропускали через колонку C₁₈ Sep-Pak («Waters», США), промывали 5 мл 200 метанола. Даисильные производные аминов элюировали 2 мл 100% метанола и использовали для анализа путем ВЭЖХ.

Клетки линии L выращивали на питательной среде Игла с глутамином и 10% сывороткой крови крупного рогатого скота [2]. В каждый флакон вносили 8000 клеток на 2 мл питательной среды. Использовали 105 флаконов. В каждую из 4 экспериментальных групп было выделено по 15 флаконов. Первая группа была контрольной. Остальные 3 группы подвергали воздействию ДФМО, МГБГ и ДФМО совместно с МГБГ соответственно. Конечная концентрация исследованных соединений в культуральной среде составила 10^{-4} М. Первую смену среды культивирования и введение исследуемых веществ в новую культуральную среду осуществляли на 4-е сутки после начального посева клеток. Через сутки из каждой группы брали по 3 флакона, подсчитывали количество клеток в камере Горяева, взвесь клеток центрифугировали при 1500 об/мин и осадок использовали для определения ПУТ и ПА методом ВЭЖХ. Во всех оставшихся флаконах меняли среду культивирования и вносили указанные вещества в исходном количестве. Последующие 2 сут поступали аналогичным образом. После 4-х сут культуры ткани L-клеток росли еще 3 дня, но без смены среды и добавления химических соединений.

Все цифровые результаты были подвергнуты математической обработке методом вариационной статистики с использованием персонального компьютера.

Результаты и обсуждение. Характерным для роста L-клеток в культуре ткани было значительное превышение концентраций СД над уровнем ПУТ и СМ и наличие сильной положительной связи между количеством клеток и внутриклеточным содержанием СД ($r=0,964$, $m_r=0,152$, $p=0,01$) и СМ ($r=0,897$, $m_r=0,255$, $p=0,05$) (рис. 1). Добавление ингибиторов в культураль-

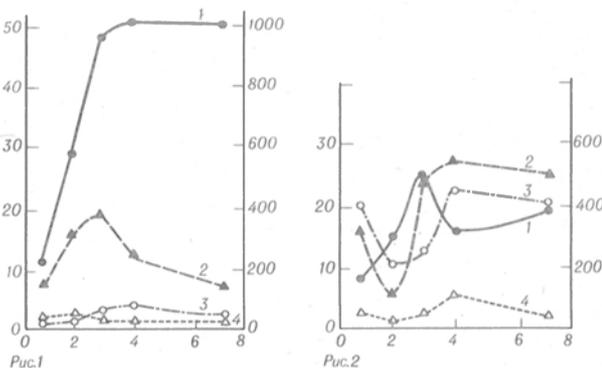


Рис. 1. Содержание ПУТ и полиаминов в L-клетках в процессе роста культуры ткани.

Здесь и на рис. 2—4: по оси абсцисс — время культивирования L-клеток, дни; по осей ординат: слева — число L-клеток (10^4 на 1 мл культуральной среды), справа — содержание поликаатионов, рМ на 10^6 клеток. 1 — L-клетки; 2 — СД; 3 — СМ; 4 — путресцин.

Рис. 2. Содержание ПУТ и полиаминов в L-клетках в процессе роста культуры ткани на фоне действия ДФМО.

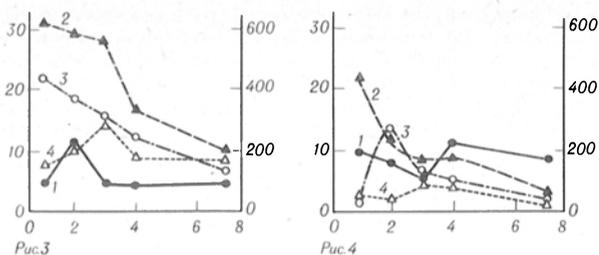


Рис. 3. Влияние МГБГ на концентрацию ПУТ и полиаминов в L-клетках в процессе роста культуры ткани.

Рис. 4. Совместное действие ДФМО и МГБГ на уровень ПУТ и полиаминов в L-клетках в процессе роста культуры ткани.

ную среду существенно тормозило скорость роста L-клеток на 4-е сутки: ДФМО и ДФМО совместно с МГБГ соответственно в 4 и 6 раз (рис. 2 и 4). При этом изменения в концентрации поликатионов при действии ДФМО опережали 2 сут сдвиги в количестве клеток в культуре и характеризовались сильной положительной связью: для ПУТ $r=0,758$ ($m_r=0,376$, $p=0,05$), для СД $r=0,843$ ($m_r=0,191$, $p=0,01$), для СМ $r=0,932$ ($m_r=0,208$, $p=0,01$). Высокая положительная связь была выявлена между степенью торможения и уровнем ПУТ ($r=0,861$, $m_r=0,293$, $p=0,05$), СД ($r=0,802$, $m_r=0,344$, $p=0,05$) и СМ ($r=0,953$, $m_r=0,173$, $p=0,01$) при действии МГБГ (рис. 3) и ПУТ ($r=0,800$, $m_r=0,339$, $p=0,05$), СД ($r=0,993$, $m_r=0,066$, $p=0,001$) и СМ ($r=0,994$, $m_r=0,061$, $p=0,001$) при совместном применении ДФМО и МГБГ (см. рис. 4).

L-клетки оказались чувствительными к действию ДФМО и МГБГ. Это хорошо согласуется с данными литературы о том, что ингибирование активности ферментов биосинтеза ПА такими веществами, как ДФМО [3, 4] и МГБГ [6] приводило к снижению скорости пролиферации опухолевых клеток. На 4-е сутки роста L-клеток в культуре ткани эти ингибиторы подавляли скорость пролиферации этих клеток на 60 и 90 % соответственно. Однако к 7-м суткам скорость деления и роста L-клеток стабилизировалась. Это указывает на обратимость ингибирования процесса клеточной пролиферации в целом данными ингибиторами и может быть связано с избирательностью такого действия в отношении к различным фазам цикла клеточного деления. Характерным оказалось то, что совместное применение ДФМО и МГБГ не приводило к полному подавлению процесса пролиферации этих клеток, хотя вызывало его более глубокое торможение, чем действие одного ДФМО.

Проведенные исследования содержания ПУТ и ПА в L-клетках в процессе роста в культуре ткани на фоне действия ингибиторов ключевых ферментов биосинтеза этих соединений выявили две характерные особенности. Так, изменения концентрации поликатионов в L-клетках и скорость роста этих клеток в культуре ткани можно рассматривать как два тесно связанных между собой процесса. Более того, изменения в концентрации ПУТ и ПА первичны по отношению к изменениям скорости роста L-клеток, поскольку они опережают их во времени, как это было показано в опытах с ингибиторами ключевых полиаминсинтезирующих ферментов.

Таким образом, ПА участвуют в реализации антипролиферативного действия ДФМО и МГБГ и могут служить биохимическими маркерами эффективности такого действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бердинских П. К., Залеток С. П. Полиамины и опухолевый рост.— Киев, 1987.
2. Шляховенко А., Бундюк Л. С., Гридина Н. Я. др. // Экспер. онкол.— 1987.— № 3.— с. 28.
3. Mamont P. S., Boklen P., McCann P. P. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1976.— Vol. 73.— P. 1626.
4. Rajala R. L., Raina A., Mantylaroi R., Tuomi K. // FEBS Meeting, 122-th: Abstracts.— Dresden, 1978.— P. 28—31.
5. Potter C. W., Sufrin G. R. / Anticancer Res.— 1986.— Vol. 6.— P. 525.
6. Seppanen P., Fagerstrom R., Alhonen-Hongisto L. et al. // Biochem. J.— 1984.— Vol. 221.— P. 483.

Поступила 18.02.91

ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF POLYAMINES AND PUTRESCINE AND THEIR USE AS BIOCHEMICAL MARKERS OF THE BIOSYNTHESIS RATE IN L-CELL CULTURE

S. P. Syatkin, T. T. Berezov, N. Ya Gridina, L. S. Bundyuk, Ya. F. Kovalishin

P. Lumumba University of People's Friendship, Moscow, R. E. Kavetsky Institute of Oncology Problems, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Effects of inhibitors of enzymes involved in biosynthesis of putrescine and polyamines on growth of mice C3H strain transformed fibroblasts as well as on the intracellular content of putrescine and polyamines were studied. Putrescine and polyamines were estimated as dansyl derivatives using HPLC. DL- α -difluoromethyl ornithine (F_2MeOrn) and methyl glyoxal-bis (quanyl hydrazone) (MGBG) were added to cultivation medium at final concentration 10^{-4} M daily within 4 days. The cell culture was not treated within the following 3 days of the experiment. Distinct exceeding of spermidine content over concentrations of putrescine and spermine proved to be the specific property of L-cells growth in the culture. Amount of cells correlated strongly with intracellular content of spermidine and spermine ($r=0,964$). Treatment of L-cells with F_2MeOrn singly or in combination with MGBG led to 4- and 6-fold decrease in their growth rate, respectively. F_2MeOrn altered content of polycations 2 days earlier in the cells which exhibited distinct correlation between putrescine and polyamines ($r=0,943$). The rate of MGBG inhibition correlated distinctly with content of putrescine and polyamines ($r=0,953$) as well as strong correlation between putrescine and polyamines content ($r=0,994$) was detected after simultaneous effect of these inhibitors. This suggests that polyamines were involved in the antiproliferative action of the inhibitors studied and may be used as markers of cytostatics chemotherapeutic efficiency.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.155.392-07:616.155.32-008.931

Н. А. Ушакова, А. Л. Власова,
М. Е. Преображенская, Р. С. Самойлова,
А. М. Полянская, М. А. Григорьева, С. А. Байдурина

ГЛИКОЗИДАЗЫ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва, НИИ гематологии и интенсивной терапии Всесоюзного гематологического научного центра Минздрава СССР, Москва

Гликозидазы представляют собой группу гидролаз, осуществляющих деградацию углеводной

части гликоконъюгатов (гликопротеинов, гликолипидов, гликозаминогликанов). В тканях животных и человека существуют две основные группы гликозидаз: кислые гликозидазы лизосом и нейтральные гликозидазы, локализованные в цитозоле и других компартментах клетки. Показано, что в опухолевых клетках, в том числе при гемобластозах, уровень активности ряда кислых гликозидаз изменен по сравнению с нормальными тканями [5, 11]. В частности, при В-клеточном хроническом лимфолейкозе (В-ХЛЛ) активность большей части гликозидаз ниже, чем в нормальных лимфоцитах периферической крови [13, 15]. Однако следует учесть, что основная популяция лимфоцитов периферической крови здоровых лиц представлена Т-хелперами, тогда как при В-ХЛЛ преобладает В-фенотип, что может являться одной из причин обнаруженных различий.

Наряду с этим в миелоидных клетках больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) активность кислых гликозидаз выше, чем в гранулоцитах здоровых доноров [2, 3, 6, 15]. При некоторых вариантах гемобластозов, кроме этого, обнаружено изменение соотношения изоформ ряда ферментов, в частности появление I-формы β -N-ацетилгексозаминидазы при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) у детей [8] и S-формы при волосатоклеточном лейкозе (ВКЛ) [9]. Вместе с тем в литературе практически отсутствуют данные о сравнительном определении активности гликозидаз при различных формах и вариантах лимфопрлиферативных заболеваний (ЛПЗ). Такой анализ мог бы оказаться полезным для понимания механизмов развития патологического процесса, а также для выяснения вопроса о возможности использования гликозидаз в качестве одного из маркеров при дифференциальной диагностике гемобластозов.

Методика. Обследовано 28 больных с различными формами ЛПЗ: В-ХЛЛ, В-клеточной неходжкинской лимфомой (В-НХЛ), В-клеточным ОЛЛ (В-ОЛЛ), Т-клеточным ОЛЛ (Т-ОЛЛ), ни Т-, ни В-ОЛЛ (ОЛЛ), Т-клеточным ХЛЛ (Т-ХЛЛ), синдромом Сезари, а также 16 больных ХМЛ. Диагноз устанавливали на основании клинико-морфологических, цитохимических и иммунохимических исследований. Фенотипическую принадлежность клеток определяли методом иммунофлюоресценции на основании экспрессии линейно-специфических и дифференцировочных антигенов, идентифицируемых моноклональными антителами [4, 10, 14]. Использовали коммерческие препараты моноклональных антител фирм «Ortho» (США), «Becton-Dickinson» (ФРГ) и «Dakopatts» (Дания) в соответствии с кластерами дифференцировки CD [12]. Фенотипическую принадлежность клеток оценивали также по степени экспрессии двух стандартных В-клеточных маркеров — мембранных иммуноглобулинов (mIg) и числу клеток, несущих рецепторы для эритроцитов мыши (ЕМ).

Лимфоидные клетки выделяли из цельной крови и костного мозга больных с различными формами и вариантами ЛПЗ, а также из концентрата лимфоцитов, полученного после сеанса лимфоцитозера с помощью центрифугирования в градиенте плотности верографии («Спюфа», ЧСФР) — фикола («Phagtasia» (Швеция) [11]. Гранулоциты из крови доноров и больных ХМЛ также выделяли, используя градиент верографии — фикола. Примесь эритроцитов удаляли гемолизом 0,83 % NH_4Cl . Клетки отмывали 0,9 % NaCl , доводили до концентрации $(20-30) \cdot 10^6$ клеток на 1 мл, лизировали 0,1 % тритоном X-100 («Serva», ФРГ) и экстрагировали при 4 °С в течение ночи в присутствии 0,01 % азиды натрия («Fluka», Швейцария). В супернатанте, полученном после центрифугирования лизата при 16 000 g в течение 40 мин, определяли активность гликозидаз.

Доля лимфоидных клеток в конечной суспензии составляла не менее 90 %. Морфологически клетки были представлены: при ХЛЛ — малыми лимфоцитами, при ВКЛ — клетками с

«бахромчатым» краем цитоплазмы (так называемые «волосатые» клетки); при В-НХЛ — наряду с малыми лимфоцитами присутствовали пролимфоциты и лимфобласты от морфологического варианта лимфосаркомы).

При определении активности кислых гликозидаз проба объемом 60 мкл включала 20 мкл исследуемого лизата лимфоцитов, разведенного в 3-5 раз 0,9 % NaCl , 20 мкл соответствующего 4-метилумбеллиферил (МУФ)-гликозида фирм «Koch-Light» (Англия) и «Serva» (ФРГ) и 20 мкл 0,1 M цитратно-фосфатного буфера (за исключением β -D-глюкуронидазы, активность которой измеряли в присутствии 0,1 M ацетатного буфера). Условия определения активности отдельных гликозидаз: N-ацетил- β -D-гексозаминидазы — 1,00 мМ (конечная концентрация) МУФ- β -D-глюкозаминид рН 4,5 (инкубация 15 мин при 37 °С); α -D-маннозидазы — 1,66 мМ МУФ- α -D-маннозид рН 4,0; β -D-глюкуронидазы — 1,00 мМ МУФ- β -D-глюкуроид рН 3,6; β -D-галактозидазы — 0,83 мМ МУФ- β -D-галактозид рН 4,5; α -L-фукозидазы — 0,83 мМ МУФ- α -L-фукозид рН 4,8-5,0 (инкубация 30 мин при 37 °С); кислой α -D-глюкозидазы — 1,00 мМ МУФ- α -D-глюкозид рН 4,0; нейтральной α -D-глюкозидазы — 1,00 мМ МУФ- α -D-глюкозид рН 6,2 (инкубация 60 мин при 37 °С). При определении активности нейтральной α -D-маннозидазы для ее стабилизации к суспензии клеток добавляли 1 мМ MnCl_2 и 2 мМ дитиотреитол («Serva», ФРГ). Суспензию клеток сохраняли при -12 °С в течение ночи, затем размороженные клетки гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе и центрифугировали 40 мин при 16 000 g. Инкубационная смесь содержала 10 мкл 5,00 мМ МУФ- α -D-маннозида, 20 мкл 0,1 M цитратно-фосфатного буфера рН 6,2; 10 мкл раствора свайсоина («Koch-Light», Англия), являющегося ингибитором кислотной α -D-маннозидазы, и 10 мкл ферментного препарата. Пробы инкубировали от 10 до 60 мин при 37 °С; в зависимости от активности фермента.

Реакцию останавливали добавлением 4 мл 0,1 M Na_2CO_3 и флюоресценцию измеряли на флюориметре БИАН-130 (λ возбуждения — 365 нм, эмиссии — 436 нм). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее отщепление 1 нм 4-метилумбеллиферона за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах активности на 10^6 клеток или на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури.

Результаты и обсуждение. Сравнение активности кислых лизосомных гликозидаз и нейтральной цитозольной гликозидазы — α -глюкозидазы — в опухолевых клетках периферической крови больных ЛПЗ и активности этих гликозидаз в миелоидных клетках больных ХМЛ показало (табл. 1), что при ХМЛ активность большинства гликозидаз существенно выше, чем при ЛПЗ. Активность α -маннозидазы, например, более чем в 100 раз выше при ХМЛ, чем при В-ХЛЛ, и в 10 раз выше по сравнению с Т-ОЛЛ, при котором наблюдаются наиболее высокие значения активности всех гликозидаз при ЛПЗ.

В лимфоидных клетках больных с В-клеточными вариантами ЛПЗ (В-ХЛЛ, В-НХЛ и ВКЛ) активность всех исследуемых гликозидаз, но особенно N-ацетил- β -гексозаминидазы, α -маннозидазы и β -глюкуронидазы, была в 2-15 раз ниже, чем в нормальных мононуклеарах. При Т-клеточных вариантах эта разница менее выражена (см. табл. 1).

Выявлены также значительные различия в активности гликозидаз в лимфоидных клетках больных с В- и Т-вариантами ЛПЗ. Так, клетки больных В-ХЛЛ, В-НХЛ, ВКЛ и В-ОЛЛ имели более низкий уровень активности N-ацетил- β -гексозаминидазы, α -маннозидазы и β -галактозидазы, чем клетки больных с Т-вариантами ЛПЗ. В группе больных с В-клеточными вариантами ЛПЗ наиболее низкие значения всех исследуемых гликозидаз обнаружены в лимфоидных клетках больных В-ХЛЛ, которые на 80-90 % представлены малыми лимфоцитами. Активность α -маннозидазы в клетках 4 из 5 больных В-ХЛЛ была крайне низкой и соответствовала уровню ее активности

Активность гликозидаз (в ед/10⁸ клеток) при разных формах ЛПЗ

Заболевание	N-ацетил-β-D-гексозаминидаза	α-D-маннозидаза	β-D-глюкуронидаза	β-D-галактозидаза	α-D-фукозидаза	α-D-глюкозидаза (кислая)	α-D-глюкозидаза (нейтральная)
В-вариант ЛПЗ:							
1. В-ХЛЛ (5)	17,7±1,5	0,6±0,1	6,0±1,3	4,3±1,2	1,6±0,2	0,7±0,3	1,3±0,3
2. В-НХЛ (6)	33,8±1,4	2,1±0,3	10,5±1,6	4,3±0,9	2,4±1,0	0,7±0,1	2,7±0,4
3. ВКЛ (5)	97,6±12,6	7,3±1,0	25,8±5,9	7,8±2,1	3,9±0,7	1,0±0,1	3,1±0,5
4. В-ОЛЛ (1)	130,2	3,0	24,4	4,9	11,5	1,0	3,1
Т-вариант ЛПЗ:							
5. Т-ХЛЛ (4)	136,1±34,4	6,7±2,7	26,3±9,9	11,5±0,8	7,6±1,2	1,7±0,5	2,6±0,3
6. Синдром Сезари (3)	147,0±45,8	9,3±4,2	30,1±3,9	17,8±7,3	7,1±2,6	1,4±0,3	3,2±0,9
7. Т-ОЛЛ (2)	244,7; 315,1	10,0; 21,3	47,9; 67,7	21,9; 50,1	9,1; 19,4	2,8; 4,4	3,6; 5,8
8. ни Т-, ни В-ОЛЛ (1)	359,3	14,1	26,4	33,1	26,2	3,9	6,3
Нормальные мононуклеары (8)	256,9±19,9	10,5±0,8	58,2±6,6	44,2±4,7	10,1±1,1	1,6±0,2	6,0±0,8
Нормальные гранулоциты (3)	154,3±8,4	38,8±3,7	50,2±3,3	12,1±0,8	8,1±4,6	4,3±0,1	13,6±0,8
ХМЛ (16)	278,7±22,2	100,0±9,2	70,2±6,7	40,9±4,7	19,2±1,8	3,4±0,5	5,1±0,7

Примечание. Разница между активностью N-ацетил-β-гексозаминидазы, α-маннозидазы и β-глюкуронидазы в группах больных 1—2 и 2—3 статистически достоверна (соответственно $p < 0,001$, $< 0,01$ и $< 0,05$). Различия между активностью других ферментов в группах 1—3 статистически недостоверны. В скобках — число образцов.

в лимфоцитах больных с генетическим дефектом синтеза этого фермента (наследственным маннозидозом), т. е. менее 1 ед. активности на 10⁸ клеток. Фенотипически клетки крови больных В-ХЛЛ могут быть отнесены к ранним В-клеткам (табл. 2).

В группу В-НХЛ входили 5 больных с пролимфоцитарным вариантом лимфосаркомы (IV стадия) и 1 больной с лимфобластным вариантом (IV стадия). Во всех случаях имела место лейкомизация (лейкоцитоз — 12,5—197 тыс., патологические клетки — 55—86 %). Активность α-фукозидазы и кислой α-глюкозидазы при НХЛ была низкой, как и при В-ХЛЛ, тогда как активность остальных кислых гликозидаз была примерно в 2—3 раза выше. Клетки больных В-НХЛ фенотипически находились на более поздних, чем при В-ХЛЛ, стадиях дифференцировки (см. табл. 2), причем степень зрелости опухолевых клеток была

различной: у одного больного клетки имели фенотип промежуточных В-клеток, у другого — зрелых, у третьего — поздних В-клеток. Однако существенных различий в активности гликозидаз в этих типах клеток не наблюдалось.

Активность гликозидаз в лимфоидных клетках больных ВКЛ заметно выше, чем в клетках больных В-ХЛЛ и В-НХЛ, особенно активность N-ацетил-β-гексозаминидазы, α-маннозидазы и β-глюкуронидазы (см. табл. 1). Активность β-галактозидазы и α-фукозидазы была незначительно выше при ВКЛ, чем при В-ХЛЛ и В-НХЛ, тогда как различия в активности кислой α-глюкозидазы в опухолевых клетках трех вышеназванных групп больных практически отсутствуют. Следует отметить, что количество «волосатых» клеток не оказывало существенного влияния на активность гликозидаз. Так, у 3 больных, у которых число

Таблица 2

Иммунологический фенотип и стадии дифференцировки лейкоэмических лимфоидных клеток

Заболевание	В-клетки (% клеток, экспрессирующих маркер)										Стадия дифференцировки В-клеток [12]
	CD 5	CD 10	CD 19	CD 20	CD 21	CD 34	CD 38	Ia	mtg	Em	
ОЛЛ	2	0	—	0	—	39	—	40	6	0	Общие предшественники лимфоидных клеток
В-ОЛЛ	9	72	—	4	—	69	46	89	—	2	Предшественники В-клеток
В-ХЛЛ	80	—	90	90	—	—	—	75	0	73	Ранние В-клетки
НХЛ	4	—	—	91	1	—	—	75	40	50	Промежуточные В-клетки
НХЛ	8	3	—	80	94	—	—	74	64	11	Зрелые В-клетки
НХЛ	0	0	90	94	0	—	0	93	93	5	Поздние В-клетки
	Т-клетки (% клеток, экспрессирующих маркер)										Стадия дифференцировки Т-клеток [13]
	CD1a	CD2	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8	CD10	CD34	CD38	
Т-ОЛЛ*	0	—	—	3	20	85	3	1	65	94	I
Т-ОЛЛ	32	—	—	30	56	62	27	17	11	54	II
Т-ХЛЛ	0	54	94	78	97	93	96	0	—	0	III
Т-ХЛЛ	3	93	94	2	12	2	93	—	—	0	IV—V (Т-супрессоры)
Синдром Сезари	0	—	96	93	80	—	—	—	—	—	IV—V (Т-хелперы)

Примечание. Звездочка — клетки костного мозга.

«волосатых» клеток составляло не более 5 %, активность N-ацетил-β-гексозаминидазы была даже несколько выше, чем в случаях, когда число «волосатых» клеток составляло 80–90 %.

В клетках большого В-ОЛЛ феногитически соответствующих предшественникам В-клеток, активность N-ацетил-β-гексозаминидазы и α-фукозидазы была несколько выше, чем при В-ХЛЛ, В-НХЛ и ВКЛ, тогда как активность α-маннозидазы, β-галактозидазы и кислой α-глюкозидазы не отличалась от их активности в трех первых группах.

В группе больных с Т-клеточными вариантами ЛПЗ различия в активности гликозидаз менее выражены, но, как уже отмечалось, в целом активность большинства гликозидаз выше, чем при В-клеточных вариантах. Так, в клетках больных Т-ХЛЛ активность гликозидаз от 2 до 20 раз выше, чем при В-ХЛЛ (см. табл. 1). Величины активности ферментов при синдроме Сезари существенно не отличались от их активности при Т-ХЛЛ.

Наиболее высокие значения активности всех гликозидаз выявлены в лимфоидных клетках больных Т-ОЛЛ и ни Т, ни В-вариантом ОЛЛ (клетки не имеют маркеров Т- и В-лимфоцитов). При этом активность некоторых гликозидаз несколько выше при Т-ОЛЛ, тогда как активность других — в клетках большого ОЛЛ. Клетки этих больных феногитически находились на наиболее ранних стадиях клеточной дифференцировки и соответствовали общим предшественникам лимфоидных клеток (ОЛЛ) и I—II стадиям тимической дифференцировки (Т-ОЛЛ) (см. табл. 2).

Высокую активность гликозидаз при ОЛЛ можно объяснить как высокой степенью пролиферации этих клеток, так и числом бластных форм в изучаемых клеточных образцах. Последнее предположение, однако, не нашло подтверждения при сравнении активности в клетках больных В-ОЛЛ и ОЛЛ, в которых число бластных форм было равным (60 %), тогда как активность гликозидаз значительно различалась. Активность гликозидаз в клетках, имеющих фенотип, соответствующий промежуточным стадиям дифференцировки В- и Т-клеток, была наиболее низкой в клетках как В, так и Т-ряда. Клетки этого типа, полученные от больных ХЛЛ, имеют, по некоторым данным [7], сниженное число лизосом, что может обусловить и низкую активность лизосомных гликозидаз. Изменение числа лизосом, вероятно, не является единственной причиной низкой активности гликозидаз при В-ХЛЛ, поскольку падение активности разных гликозидаз различно по сравнению с их активностью в клетках — предшественниках В-клеток (В-ОЛЛ). Можно предположить, что при В-ХЛЛ не только нарушается лизосомный аппарат, но также изменяется экспрессия отдельных гликозидаз.

В лимфоидных клетках некоторых больных была также определена активность нейтральной α-маннозидазы — фермента, локализованного в цитозоле и участвующего в обмене маннозосодержащих соединений наряду с кислой α-маннозидазой. Активность нейтральной α-маннозидазы (табл. 3) была приблизительно одинакова в нормальных мононуклеарах и в клетках больных с Т- и В-клеточными вариантами ЛПЗ, тогда как активность кислой α-маннозидазы, как указано выше,

Таблица 3
Активность нейтральной и кислой α-маннозидаз в лимфоидных клетках в норме и при ЛПЗ

Источник клеток	Активность, ед/мг белка		
	нейтральная	кислая	нейтральная/кислая
Цитологический: В-ХЛЛ (3)	1,4 [1,3—1,6]	0,3 [0,2—0,4]	4,3
В-НХЛ (1)	0,8	0,8	1,0
Т-НХЛ (1)	0,9	1,9	0,3
синдром Сезари (1)	0,7	1,4	0,5
Нормальных: Т-лимфоцитоз* (1)	0,7	0,3	2,3
здоровые доноры (7)	0,9 [0,5—1,5]	0,8 [0,3—1,2]	1,1

Примечание. Представлены средние данные, из круглых скобок — число случаев, в квадратных — разброс данных. Звездочка — нормальный фенотип Т-клеток.

была ниже при В-ХЛЛ. При сопоставлении активности нейтральной и кислой α-маннозидаз в клетках одного типа видно, что при В-ХЛЛ в клетках преобладает активность нейтральной α-маннозидазы, при В-НХЛ активность кислой и нейтральной α-маннозидазы практически равна, тогда как при Т-клеточных вариантах заболевания выше активность кислой α-маннозидазы. Следует отметить, что активность цитозольных (нейтральных) гликозидаз — α-глюкозидазы и α-маннозидазы — изменяется при ЛПЗ меньше, чем активность лизосомных (кислых) гликозидаз. В некоторых случаях, например при В-ХЛЛ, а также при ХМЛ, изменения активности нейтральных и кислых гликозидаз носит противоположно направленный характер, что, возможно, обусловлено компенсаторной реакцией. Преобладание активности нейтральной α-маннозидазы по отношению к кислой может служить характерным признаком лимфоидных клеток больных В-ХЛЛ.

Учитывая небольшое количество исследуемого материала, представленные данные следует рассматривать как предварительные.

Результаты проведенных исследований позволяют сделать заключение, что величины активности гликозидаз в клетках периферической крови больных с разными формами и вариантами гемобластозов различаются. В лимфоидных клетках больных ЛПЗ активность гликозидаз ниже, чем в нормальных мононуклеарах и гранулоцитах, и значительно ниже, чем в изсерлах миелоидных клеток больных ХМЛ. В группе больных ЛПЗ более высокая активность гликозидаз наблюдалась у больных с Т-клеточными, чем с В-клеточными вариантами. Среди больных с В-клеточными вариантами заболеваний наиболее высокая активность выявлена в лимфоидных клетках больных ОЛЛ и ВКЛ, наиболее низкая — в клетках больных ХЛЛ. При Т-клеточных вариантах наиболее высокая активность обнаружена у больных ОЛЛ, однако различия между отдельными формами заболеваний менее выражены, чем при В-клеточных вариантах. Анализ зависимости активности гликозидаз от фенотипа и стадии дифференцировки лимфоидных клеток больных показал, что более

высокая активность гликозидаз наблюдается в клетках, имеющих фенотип, соответствующий ранним стадиям дифференцировки: общих предшественниках лимфоидных клеток, предшественниках В-клеток и клетках на первой стадии тимической дифференцировки. В клетках, имеющих фенотип, соответствующий более поздним стадиям дифференцировки, активность гликозидаз ниже. Наиболее существенные различия между формами и вариантами ЛПЗ наблюдаются для трех гликозидаз: β -глюкуронидазы, α -маннозидазы и N-ацетил- β -гексозаминидазы. Определение активности этих гликозидаз в лимфоидных клетках может быть полезным при дифференциальной диагностике ЛПЗ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бейум А. // Лимфоциты: Выделение, фракционирование и характеристика / Под ред. Дж. Б. Натвига, П. Перламани, Х. М. Вигзелли. — М., 1980. — С. 9—19.
2. Преображенская М. Е., Власова А. Л., Ушакова Н. А. // Бюл. экпер. биол. — 1988. — № 7. — С. 92—94.
3. Преображенская М. Е., Геворкян Н. М. // Там же. — 1985. — № 12. — С. 697—700.
4. Самойлова Р. С., Даровский Б. М., Лукина Е. А., Полянская А. М. // Тер. арх. — 1986. — № 9. — С. 72—77.
5. Bernacki R. J., Niedbala M. J., Korytnyk W. // Cancer Metast. Rev. — 1985. — Vol. 4, N 1. — P. 81—102.
6. Besley G. T. H., Moss S. E., Bain A. D., Dewar A. E. // J. clin. Path. — 1983. — Vol. 36, N 9. — P. 1000—1004.
7. Douglas S. D., Cohnen G., König E., Britlinger G. // Blood. — 1973. — Vol. 41, N 4. — P. 511—518.
8. Ellis R. B., Papson N. T., Patrick A. D. et al. // New Engl. J. Med. — 1978. — Vol. 298. — P. 476—480.
9. Emiliani C., Sciarra R., Orlandi A., Stirling J. A. // Biochim. biophys. Acta. — 1990. — Vol. 1037, N 3. — P. 265—273.
10. Foon K. A., Todd R. F. // Blood. — 1986. — Vol. 68, N 1. — P. 1—31.
11. Goldberg D. M., Brown D. // Clin. chim. Acta. — 1987. — Vol. 169, N 1. — P. 1—76.
12. Knapp P., Rieber P., Dorken B. et al. // Immunol. Today. — 1989. — Vol. 10, N 8. — P. 253—258.
13. Kraaijenhagen R. J., Shipper-Kester G. P. M., Rijkasen G. et al. // Clin. chim. Acta. — 1982. — Vol. 118, N 2. — P. 255—263.
14. Scott C. S., Stark A. N., Minowada J., Drexler H. G. // Leucemia Res. — 1988. — Vol. 12, N 2. — P. 129—134.
15. Tanaka T., Kobayashi M., Horino N. et al. // Hiroshima J. med. Sci. — 1980. — Vol. 29, N 3. — P. 125—132.

Поступила 07.03.91

GLYCOSIDASES OF LYMPHOID CELLS IN PATIENTS WITH DIFFERENT FORMS OF LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS

N. A. Ushakova, A. L. Vlasova, M. E. Preobrazhenskaya, R. S. Samoylova, A. M. Polyanskaya, M. A. Grigoryeva, S. A. Baydurin

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Hematology and Intensive Therapy, All-Union Hematological Centre, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Activity of 8 glycosidases (6 acid lysosomal and 2 neutral cytosolic enzymes) was estimated in lymphoid cells of 28 patients with different forms of lymphoproliferative disorders: B- and T-chronic lymphocytic leukemia (CLL), non-Hodgkins lymphoma (NHL), Sezary syndrome, hairy cell leukemia (HCL) and B- and T-acute lymphoblastic leukemia (ALL). Activity of these glycosidases was also studied in mononuclear cells and granulocytes of healthy volunteers and in immature myeloid cells of 16 patients with chronic myeloid leukemia (CML). In lymphoid cells of all the patients studied (except of ALL) the glycosidases activity was decreased as compared with that of normal mononuclear cells and immature myeloid cells. Activity of the majority enzymes studied was higher in T-lymphoid cells of patients with lymphoproliferative disorders as

compared with B-cells. The highest glycosidases activity was found in ALL cells and the lowest — in CLL cells of the patients with B-lymphoid cells forms of the disease. Activities of N-acetyl- β -D-hexosaminidase, α -D-mannosidase and β -D-glucuronidase were distinctly dissimilar in cells of the patients with B-CLL, B-NHL and HCL. Estimation of these glycosidases activity in lymphoid cells may be of importance in differential diagnosis of lymphoproliferative disorders.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.36-018.1:576.3471-008.939.633.2-02:615.277.41-092.9

С. Н. Федоров, Р. М. Балански, Л. Б. Новиков, Г. И. Леванова, А. Я. Лихачев, В. Н. Анисимов, К. П. Хансон

ИССЛЕДОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ПЕЧЕНИ КРЫС, ОБРАБОТАННЫХ 1,2-ДИМЕТИЛГИДРАЗИНОМ

НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова Минздрава СССР, Ленинград; Национальный онкологический центр, София

Известно, что митохондриальная ДНК (мДНК) подвергается модификации различными канцерогенами в несколько раз интенсивнее, чем ядерная ДНК [2, 15, 19, 20]. Однако количество промутагенных аддуктов, образующихся в мДНК, невелико. Для бензпирендиол-эпоксида (БПДЭ) оно равно 16 на 1 молекулу мДНК [12]. Для алкилирующих канцерогенов количество образующихся промутагенных оснований, по-видимому, еще ниже [3, 13, 14].

При химическом канцерогенезе мутации возникают в определенных нуклеотидных последовательностях значительно чаще, чем в других; при этом разные по химической структуре канцерогены вызывают мутации в одних и тех же «горячих точках» генов [4, 5, 8, 9, 17]. Существуют ли подобные «горячие точки» в митохондриальном геноме, неизвестно. При действии этилметансульфоната, БПДЭ, N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидина не удалось обнаружить специфические мутации в области D-петли и неклонированный фрагмент мДНК клеток HeLa через 2—3 нед после введения канцерогенов [12].

Мы предприняли попытку исследовать в этом отношении другую область митохондриального генома — 5'-конец гена 16S РНК — в ранние сроки после аппликации канцерогена 1,2-диметилгидразина (ДМГ). Для реализации мутагенного эффекта о-6-мГуа мДНК крысы, метилированная *in vivo*, подвергалась репликации в штамме *E. coli* HB 101, дефектном по о-6-мГуа-метилтрансферазе [11].

Методика. Белым беспородным крысам массой 100—150 г подкожно вводили ДМГ (20 мг на 1 кг массы тела). Все манипуляции проводили под хлороформным наркозом.

мДНК была выделена из печени крыс через 20 ч после введения канцерогена [16] и обработана эндонуклеазой Bam HI, фрагменты мДНК, Bam A (11 т. п. н) и Bam B (5 т. п. н) лигировали с рBR322 по Bam HI сайту и проводили трансформацию *E. coli* [6].

Реконбиантные плазмиды, содержащие Bam A-фрагмент, были накоплены, вставки были выделены с помощью рестрикционной эндонуклеазы Bam HI [1]. 5'-Конец гена 16S РНК был выделен препаративным электрофорезом из Bam A-фрагментов после рестрикции эндонуклеазой Hind III и EcoRI.

Полученные фрагменты были лигированы с M13 mp9 и M13 mp8 репликативными формами фагов по оппозицион-

5' AATTCAT[△]AA AAATGAACAC TTTGAACATA CCCTAGCCCT
 -----EcoRI 20 30 40
 ACAACCAACC AACATAACTA AACCCCCACA TAAACTAAAA
 50 60 70 80
 CATTTAACTC AAAAAGTATT GGAGAAAGAA ATTTACTTAC
 90 100 110 120
 CA^GA^GGAGCTAT AGAGAAAGTA CCGCAAGG^GA^AATG^AITG^GAAA
 130 140 150 160
 GACTAATTTA AAGTAAAA^CAAG^ACAAGA TTAACCT^TGT
 170 180 190 200
 ACCTTTTGCA TAATGAATTA ACTAGAAAAT CCTTAACAAA
 210 220 230 240
 AAGAATTTAA GCTAAGAACC CCGAAACCAA ACGAGSTACC
 250 260 270 280
 TAAAAACAAT TTCATGAATC AACCCGTCTA TGTAGCAAAA
 290 300 310 320
 TAGTGGGAAG ATTTTAGGT AGAGGTGAAA AGCSTATCGA
 330 340 350 360
 GCTTGGTGAT AGCTGGTTGC CCAAAAAAGA ATTTCAAGTTC
 370 380 390 400
[△]AAACTTTA 3'
 Hind III

5'-Конец гена большой рибосомальной РНК мДНК крыс.

Треугольник острием вверх — делеция; треугольник острием вниз — инсерция; прямоугольник — транзиция.

ным сайтам Hind III и EcoRI и клонированы в *E. coli* JM 101. Рекомбинантные фаги были изолированы и сиквенированы по Сэнгеру, как описано в инструкции к наборам фирмы «Amersham» по «Клонированию и сиквенированию в фагах M13».

Результаты и обсуждение. Мы определили первичную структуру 5'-конца гена большой рибосомальной РНК мДНК через 20 ч после введения ДМГ. Было проанализировано 5 независимых клонов, содержащих указанный фрагмент. Нуклеотидные последовательности были идентичными для всех 5 изолированных клонов и отличались от опубликованной ранее структуры этого фрагмента [18] (см. рисунок). Были найдены А-Г транзиция в позициях 123 и 155 от EcoRI сайта, Г-А — в позиции 149, С-Т — 180, А:Т делеция в позициях 8, 151, 152, 184, 401, Т:А инсерция — 198. Сиквенирование обеих цепей одного из полученных клонов продемонстрировало их полную комплементарность.

Аналогичная работа по сиквенированию 5'-конца гена 16S РНК интактных крыс показала отсутствие различий в нуклеотидных последовательностях между контрольными и подопытными животными. Следует отметить, что мутации в положениях 8, 123, 152, 184, 198 и 401 были ранее найдены в исследуемой области митохондриальной мДНК [10].

Таким образом, обнаруженные нами различия представляют собой внутривидовую дивергенцию нуклеотидных последовательностей, а полученные результаты в целом свидетельствуют об отсутствии мутаций, обусловленных действием ДМГ. Нам не удалось обнаружить мутаций в 5'-конце гена 16S РНК, которые могли бы быть следствием действия ДМГ. Основная причина этого, как нам кажется, состоит в том, что 5'-конец гена 16S РНК, по-видимому, не является областью преимущественного метилирования по сравнению с другими областями мДНК. С другой стороны, низкая метилтрансферазная активность

в *E. coli* могла оказаться достаточной для репарации промутагенных оснований в клонируемом фрагменте. Учитывая незначительную частоту образования промутагенных оснований на 1 молекулу мДНК, выявление мутаций, индуцированных канцерогенами, является трудной задачей, требующей анализа большого числа индивидуальных клонов.

Таким образом, изучение молекулярных механизмов химического канцерогенеза привело к открытию сайтспецифического мутагенеза в генах-мишенях [4, 5, 7—9, 17]. Митохондриальный ген млекопитающих изучен в этом отношении недостаточно. Мы предприняли попытку идентификации «горячих точек» мутаций в 5'-конце гена 16S — мРНК крыс в ранние сроки после введения алкилирующего канцерогена ДМГ. Наши предварительные результаты позволили идентифицировать только внутривидовую дивергенцию нуклеотидных последовательностей и показали отсутствие мутаций, индуцированных ДМГ. Это позволяет предположить, что данная область мДНК, по-видимому, не является преимущественной мишенью для действия алкилирующего канцерогена ДМГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.* Молекулярное клонирование: Пер. с англ.— М., 1984.
2. *Backer J. M., Weinstein J. B.* // *Cancer Res.*— 1982.— Vol. 42, N 7.— P. 2764—2769.
3. *Bedell M. A., Lewis J. G., Billings K. S.* et al. // *Ibid.*— N 8.— P. 3079—3083.
4. *Burns P. A., Allen F. L., Glickman B. W.* // *Genetics.*— 1986.— Vol. 113, N 4.— P. 811—819.
5. *Burns P. A., Gordon A. J., Glickman B. W.* // *Carcinogenesis.*— 1988.— Vol. 9, N 9.— P. 1607—1610.
6. *Dagerl M., Ehrlich S.* // *Gene.*— 1979.— Vol. 6, N 1.— P. 21—28.
7. *Glickman B. W.* // *Genome.*— 1989.— Vol. 31, N 2.— P. 584—589.
8. *Gordon A. J., Burns P. A., Glickman B. W.* // *Mutat. Res.*— 1988.— Vol. 201, N 1.— P. 219—228.
9. *Horsfall M. J., Glickman B. W.* // *Carcinogenesis.*— 1988.— Vol. 9, N 9.— P. 1529—1532.
10. *Kobayashi M., Seki T., Yaginuma K.* et al. // *Gene.*— 1981.— Vol. 16, N 1.— P. 297—307.
11. *Lindahl T.* // *Ann. Rev. Biochem.*— 1982.— Vol. 51.— P. 61—87.
12. *Mita S., Monnat R. J., Loeb L. A.* // *Cancer Res.*— 1988.— Vol. 48, N 16.— P. 4578—4583.
13. *Mayers K. A., Saffhill R., O'Connor P. J.* // *Biochem. Soc. Trans.*— 1986.— Vol. 4, N 1.— P. 266—267.
14. *Mayers K. A., Saffhill R., O'Connor P. J.* // *Carcinogenesis.*— 1988.— Vol. 9, N 2.— P. 285—292.
15. *Niranjan B. G., Bhot N. K., Avadhani N. G.* // *Science.*— 1982.— Vol. 215, N 1.— P. 73—75.
16. *Palva T. K., Palva I. T.* // *FEBS Lett.*— 1985.— Vol. 192, N 2.— P. 267—270.
17. *Richardson K. K., Richardson F. C., Crosby R. M.* et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*— 1987.— Vol. 84, N 1.— P. 344—348.
18. *Saccone C., Cantatore P., Gadaletta G.* et al. // *Nucl. Acids Res.*— 1981.— Vol. 9, N 16.— P. 4139—4148.
19. *Wilkinson R., Hawks A., Pegg A.* // *Chem.-Biol. Interact.*— 1975.— Vol. 10, N 1.— P. 157—167.
20. *Wunderlich V., Schutt M., Butler M.* et al. // *Biochem. J.*— 1970.— Vol. 118, N 1.— P. 99—109.

Поступила 18.03.91

PROPERTIES OF MITOCHONDRIAL DNA FROM LIVER TISSUE OF RATS TREATED WITH 1,2-DIMETHYL HYDRAZINE

S. N. Fedorov, R. M. Balansky, L. B. Novikov, G. I. Levanova, A. Ya. Likhachev, V. N. Anisimov, K. P. Khanson

Primary structure of 5'-end 16S RNA gene of mitochondrial DNA (mDNA) isolated from rat liver tissue within 20 hrs after treatment with 1,2-dimethyl hydrazine, was analyzed. The preparations studied did not contain mutations induced by the drug. The region of mDNA analyzed appears not to be a preferential target for mutagenic effect of 1,2-dimethyl hydrazine under these experimental conditions.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 616.33-006.6-018.1:576.385.5]-07

К. П. Хансон, В. П. Калиновский, Л. Б. Новиков, С. Н. Федоров

БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГАСТРОКАНЦЕРОГЕНЕЗА У ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова Минздрава СССР, Ленинград

Этиологические факторы, способствующие развитию рака желудка, многочисленны, но конкретные причины возникновения рака желудка остаются неизвестными. Молекулярно-генетическое исследование РЖ развито сравнительно слабо [7].

В настоящей работе изучали экспрессию и структуру протоонкогенов при раке желудка у человека и в процессе экспериментального гастроканцерогенеза, индуцированного у крыс N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (МНИГ).

Методика. Под наблюдением находилось 35 больных, из них 32 страдающих карциномой и 3 — язвой желудка. Исследовали ткани опухолей желудка, метастазы рака желудка в регионарные лимфатические узлы, иссеченные язвы желудка и лимфоциты периферической крови этих больных. Контролем служила макроскопически не измененная слизистая оболочка желудка этих больных, взятая по краю резекции. Индукцию карцином железистой части желудка крысы вызывали введением с питьевой водой раствора МНИГ в концентрации 167 мг/л в течение 7 мес. Опыты проведены на 250 белых нелинейных крысах-самцах. Возраст животных в начале опыта составлял 2,5—3 мес. Слизистую оболочку и карциномы желудка крысы сразу после ее удаления охлаждали, тщательно промывали физиологическим раствором и использовали в дальнейших опытах. Контролем служила слизистая оболочка интактных крыс соответствующей возрастной группы. Материал у животных получали спустя 1 и 9 сут, 3, 7, 12, 18 и 24 мес после начала введения МНИГ.

В каждом случае исследовали по 5—10 крыс. Аденокарциномы развивались через 1,5—2 года после начала вве-

дения МНИГ. ДНК и РНК выделяли из тканей фенол-детергентным методом, как описано ранее [4]. Очищенные препараты РНК анализировали электрофоретически в 1 % геле агарозы на наличие фракций 28S, 18S и 4S, после чего использовали для количественной оценки экспрессии протоонкогенов методом гибридизации в пятне [5]. Величину транскриптов определяли по методике, описанной ранее [3], с применением формальдегида. Локусы протоонкогенов в геномной ДНК исследовали с помощью рестрикционного анализа с применением эндонуклеаз Bam HI, Pvu II, Pst I, Msp I, Bcl I, Mvu I, EcoRI и BspRI (НПО «Фермент», СССР). Образцы проб после рестрикционного анализа подвергали электрофорезу в 0,8 % геле агарозы («Sigma», США) с переносом на нейлоновые мембраны («Хийду Калур», СССР) по методу [13]. Предгибридизацию проводили в течение 4—6 ч при 42 °С в растворе, содержащем 50 % формамид, раствор Денхарта, 5×SSC, 4×; 100 мкг/мл ДНК спермы лосося, 0,2 % додецилсульфата натрия (ДСН). Гибридизацию осуществляли в течение 16—24 ч в растворе того же состава с добавлением ДНК-пробы с удельной радиоактивностью (1,0—2,0)·10⁸ имп/мин/мкг, меченой в реакции ник-транслации ³²P-дЦТФ 111 пБк/моль, «Amersham», Великобритания, или «Изотоп», СССР). [3]. Использовали следующие онкоспецифические пробы: вставку онкогена человека c-Ha-ras 1 (плазмида pEJ 6.6) [14], pv-Ki-ras (плазмида pHi—Hi-3) [9], pN-ras (плазмида pNp-1)-фрагмент [15], pv-src (плазмида pRc-11) [1], pv-myc [16], pv-fos [8], pv-abl [8] и pv-sis [11]. В качестве ДНК-пробы использовали также фрагмент генома крысы, содержащего 3'-участок 18S рДНК, полный ген 5,8S рДНК, 5'-фрагмент 28S рДНК [12]. Отмывку фильтров от негибридизовавшейся пробы и аутордиографию проводили по описанной методике [4]. Интенсивность гибридизации определяли денситометрически на микрофотометре МФ-4.

Результаты и обсуждение. В I серии опытов изучали экспрессию широкого набора протоонкогенов в образцах карцином желудка человека, взятых при операциях. Определяли уровень экспрессии следующих протоонкогенов: c-myc, N-myc, c-fos, yes, Ha-ras 1, Ki-ras 2, N-ras, Abl, Src 1, Raf 1, Met и Mos. Методом гибридизации в пятне удалось выявить активацию экспрессии лишь c-myc, c-fos, Ha-ras 1, Ki-ras 2, N-myc и Raf 1.

На рис. 1 представлены результаты определения уровня экспрессии протоонкогена c-myc в тканях опухоли и слизистой оболочки желудка человека. В большинстве случаев сигнал радиоактивности в дотах усиливается в опухоли в 4 раза, но в некоторых случаях усиление сигнала отмечается и в неизмененной слизистой оболочке желудка больных людей. Аналогичная картина наблюдалась при исследовании экспрессии протоонкогена c-fos (рис. 2). Усиление экспрессии протоонкогена Ha-ras 1 в карциномах желудка исследованных больных наблюдалось значительно реже, чем c-myc и c-fos. При этом увеличение накопления транскриптов, достигающее 4- и 8-кратного уровня в случае Ha-ras 1, выявилось только в карциноме и ее метастазе и не обнаруживалось в при-

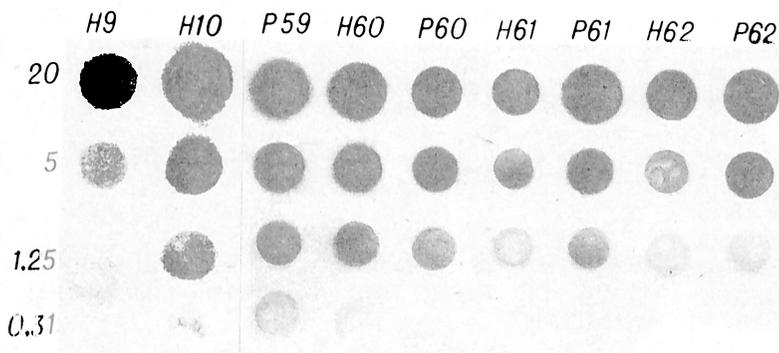


Рис. 1. Экспрессия протоонкогена c-myc в тканях опухоли и слизистой оболочки желудка человека.

Гибридизация в пятне препаратов тотальной клеточной РНК с пробой pv-myc. Здесь и на рис. 2 и 3, 7, 8: слева — количество РНК (в мкг), содержащейся в каждом разведении; H — норма, P — рак, цифры — номера историй болезни.

Рис. 2. Экспрессия протоонкогена *c-fos* в тканях опухоли и слизистой оболочки желудка человека.

Гибридизация в пятне препаратов тотальной клеточной РНК с пробой *pv-fos*. *Мр* — метастаз рака желудка.

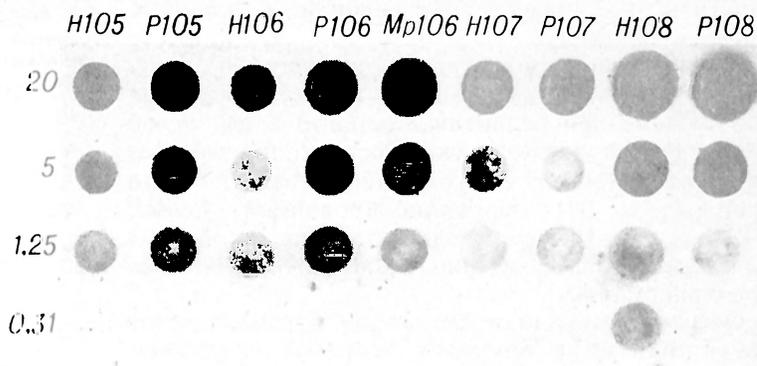


Таблица 1

Экспрессия протоонкогенов *c-fos*, *c-myc*, *N-myc*, *Ha-ras1*, *Ki-ras2* и *Raf-1* в тканях желудка человека

Всего обследовано	Имеют повышенную экспрессию					
	<i>c-fos</i>	<i>c-myc</i>	<i>N-myc</i>	<i>Ha-ras1</i>	<i>Ki-ras2</i>	<i>Raf-1</i>
30 Нж 25	3	5	1	—	1	—
Рж 23	11	12	2	3	2	—
МРж 8	6	6	—	3	—	3
Яж 3	—	—	1	—	1	—

Примечание. Прочерк — экспрессия протоонкогена не изменена. Цифровые значения показывают кратность увеличения экспрессии протоонкогенов. Я — язва желудка.

усиление экспрессии протоонкогенов *c-myc* (12 из 23) и *c-fos* (11 и 23), причем увеличение числа транскриптов этих генов выявляется как в морфологически не измененной слизистой оболочке желудка, так и в самой опухоли и ее метастазах (см. табл. 1). Это указывает на возможность участия генов *c-myc* и *c-fos* в процессах трансформации клеток слизистой оболочки желудка.

В дальнейшем методом блот-анализа были определены размеры транскриптов *c-myc*, *c-fos*, *Ha-ras1*. На рис. 4 приведены результаты проведенного исследования. Размер транскриптов *c-myc* и *Ha-ras1* (см. рис. 4) стабилен во всех исследованных тканях желудка больных и составляет соответственно 2,4 и 1,4 т. н. В случае *c-fos* в неизменной слизистой оболочке в двух вариантах с характерным для образцов транскриптов 2,2 т. н. выявлена дополнительная фракция *c-fos* специфической иРНК длиной 2,6 т. н. Однако только в одном случае это сочеталось с возрастанием уровня экспрессии *c-fos*. Следовательно, изменение экспрессии *c-fos* в слизистой оболочке больных раком желудка может выражаться как в увеличении числа молекул иРНК, так и в накоплении разных по длине транскриптов протоонкогена (см. рис. 4).

Известно несколько механизмов активации протоонкогенов: амплификация, транслокация, снижение уровня метилирования регуляторных

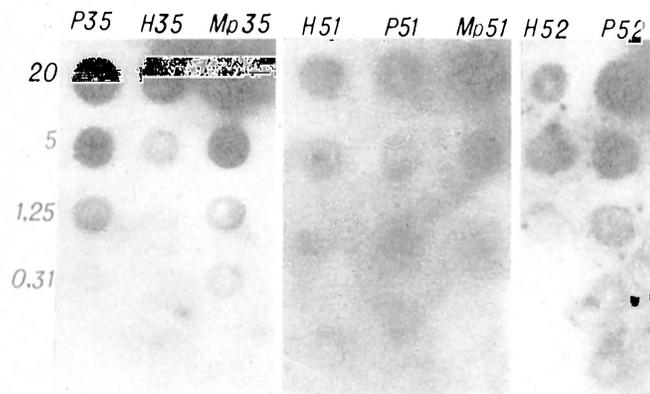


Рис. 3. Экспрессия протоонкогена *c-Ha-ras1* в тканях опухоли и слизистой оболочки желудка человека.

Гибридизация в пятно препаратов тотальной клеточной РНК с пробой E1 6.6.

легающей слизистой оболочке. Особенностью активации экспрессии *Ha-ras1* является то, что она может наблюдаться в первичной опухоли (рис. 3, P 35), усиливаться в метастазе (см. рис. 3, Мр 35) или появляется впервые только в метастатическом опухолевом узле (см. рис. 3, Мр 51).

Дополнительное накопление транскриптов протоонкогена *Raf-1* наблюдалось лишь в некоторых метастазах карциномы желудка в лимфатических узлах. Не происходило усиления экспрессии *Raf-1* также в прилегающей к опухоли неизменной слизистой оболочке желудка. В некоторых случаях удалось выявить усиление экспрессии протоонкогенов *N-myc* и *Ki-ras2*. Накопление транскриптов этих генов отмечалось в одних и тех же образцах и не коррелировало с уровнем экспрессии других протоонкогенов (табл. 1).

Анализ результатов исследования экспрессии протоонкогенов *c-myc*, *c-fos*, *Ha-ras1*, *Ki-ras2*, *N-myc*, *Raf-1* показывает, что наиболее часто в карциномах желудка человека обнаруживается

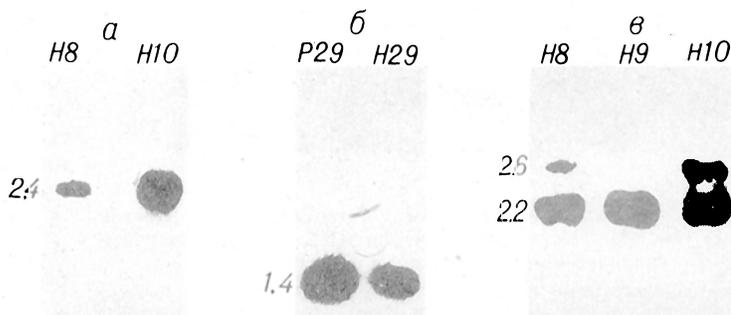
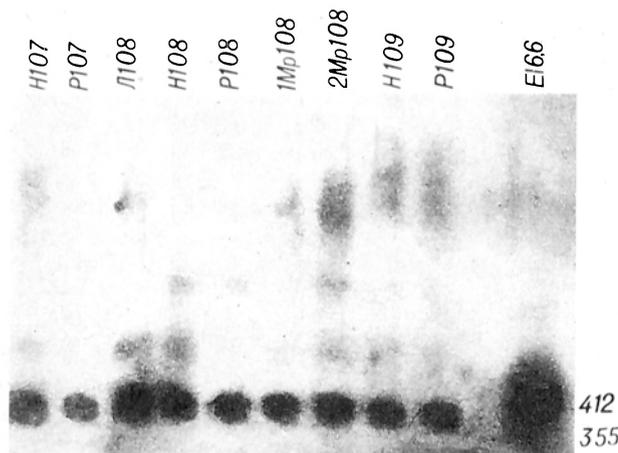


Рис. 4. Northern-blot *c-myc* (а), *c-Ha-ras* (б), *c-fos* (в).

Транскрипты протоонкогена *c-myc*, *c-Ha-ras1* и *c-fos* в препаратах тотальной клеточной РНК, фракционированной электрофорезом в 1% геле азарозы. Слева указана длина молекулы иРНК (в т. н.).

Генотип больных по протоонкогену *Ha-gas1*, установленный на основании размеров его ВТП

№ историч. болезни	Шифр ткани	Величина ВТП		Генотип больного	Примечание
1	Нж 4	2,2	1,5	A ₃ /A ₂	
	Рж 4	2,2	1,5		
6	Нж 17		1,5	A ₂ /A ₂	
	Рж 17		1,5		
7	Нж 29		1,0	A ₁ /A ₁	
	Рж 29		1,0		
11	Нж 34		1,0	A ₁ /A ₁	
	Рж 34		1,0		
12	Нж 35	1,5	1,0	A ₂ /A ₁	
	Рж 35	1,5	1,0		
	Мрж 35	1,5	1,0		
13	Мрж 36		1,0	A ₁ /A ₁	
	Нж 37		1,0		
14	Нж 37		1,0	A ₁ /A ₁	
	Яж 37		1,0		
15	Нж 39	2,2	1,0	A ₃ /A ₁	
	Рж 39	2,2	1,0		
16	Рж 50	2,2	1,0	A ₃ /A ₁	
	Нж 51		1,0		
17	Рж 51		1,0	A ₁ /A ₁	
	Мрж 51		1,0		
18	Рж 52		1,0	A ₁ /A ₁	
	Л 53	2,6	1,0		
19	Рж 53	2,6	1,0	A ₄ /A ₁	
	Л 57	1,5	1,0		
20	Рж 57	1,5	1,0	A ₂ /A ₁	
	Рж 57	1,5	1,0+ +2,2		
26	Нж 100		1,0	A ₁ /A ₁	
	Яж 100		1,0		
27	Л 101		1,0	A ₁ /A ₁	
	Нж 101		1,0		
28	Яж 101		1,0	A ₂ /A ₁	
	Л 102	1,5	1,0		
28	Нж 102	1,5	1,0	A ₄ /A ₁	
	Рж 102	1,5	1,0		
	Л 103	2,6	1,0		
	Нж 103	2,6	1,0		
	Рж 103	2,6	1,0		
	Мрж 103	2,6	1,0		
30	Л 104		1,0	A ₁ /A ₁	
	Нж 104		1,0		
	Рж 104		1,0		
31	Мрж 104		1,0	A ₄ /A ₁	
	Нж 105	2,6	1,0		
	Рж 105	2,6	1,0		
31	Л 106	1,5	1,0	A ₂ /A ₁	
	Нж 106	1,5	1,0		
	Рж 106	1,5	1,0		
33	Мрж 106	1,5	1,0	A ₃ /A ₁	
	Нж 107	2,2	1,0		
	Рж 107	2,2	1,0		
33	Л 108	1,15	1,0	A _{1.25} /A ₁	
	Нж 108	1,15	1,0		
	Рж 108	1,15	1,0		
33	1Мрж 108	1,15	1,0	A ₄ /A ₃	
	2Мрж 108	1,15	1,0		
	Л 109	2,6	2,2		
33	Нж 109	2,6	2,2	A ₄ /A ₃	
	Рж 109	2,6	2,2		

Появление аллеля A₃Присутствует редкий аллель A_{1.25}Рис. 5. Гибридизация субпробы 0,37, содержащей 1-й экзон онкогена *c-Ha-gas1*, с препаратами ДНК человека и пробой E1 6.6, гидролизованых ферментов *Msp1*.Слева указана величина *Msp1*-рестрикционных фрагментов (в п. о.). Точковые мутации при раке желудка не выявлены.

дом рестрикционного анализа с использованием набора рестриктаз: *BamHI*, *PvuII*, *PstI*, *MspI*, *BspI*, *MvaI*, *BspRI*. Фрагментированные препараты ДНК гибридизовали с пробой E1 6.6, содержащей все функциональные элементы онкогена *Ha-gas1*. Генотип исследованных больных устанавливали по длине ВТП (табл. 2) [6]. Анализ показывает, что наиболее часто представлен аллель A₁ протоонкогена *Ha-gas1*. Аллели A₂, A₃ и A₄ присутствуют значительно реже. Лишь у одного больного (см. табл. 2, № 34) выявлен редкий аллель A_{1.25} протоонкогена *Ha-gas1*. В целом



Рис. 6. Амплификация с-*Na-gas I* в аденокарциноме и метастазе желудка человека.

Гибридизация пробы Е1 6.6 с геномной ДНК желудка человека.

распределение аллелей *Na-gas I* в геноме больных карциномой желудка человека оказалось аналогичным их представительству в нормальных популяциях людей [6]. У одного больного (см. табл. 2, № 12) выявлена примерно 4-кратная амплификация *Na-gas I* протоонкогена в опухоли и 8-кратная — в метастазе в лимфатический узел большого сальника (рис. 6).

Таким образом, в карциномах желудка человека обнаружено усиление экспрессии протоонкогенов *c-myc* (52 % случаев), *c-fos* (48 %), *Na-gas I* (13 %), *Ki-ras 2* (9 %) и *N-myc* (9 %). Не выявлено мутации в 12-м кодоне протоонкогена *Na-gas I*. Наконец, не обнаружено корреляции между клинической стадией развития рака желудка и уровнем экспрессии исследованных протоонкогенов.

В следующей серии экспериментов дана молекулярно-генетическая характеристика процесса экспериментального гастроинтестинального канцерогенеза, индуцированного у крыс МННГ. В этом разделе работы изучена экспрессия указанных выше протоонкогенов, рибосомальных генов и генов митохондриальной ДНК в клетках эпителия желудка крыс в динамике гастроинтестинального канцерогенеза, а также в аденокарциноме желудка крыс, индуцированной МННГ. Ни в одном из исследованных сроков канцерогенеза (24 ч, 9 дней, 3, 7, 12, 18 и 24 мес) не выявлено изменений в количестве транскриптов протоонкогенов: *c-fos*, *c-myc*, *N-myc*, *Na-gas I*, *Ki-ras 2*, *N-ras*, *met*, *abl*, *raf 1*, *mos* и *src 1*, т. е. активность экспрессии не изменялась в процессе канцерогенеза. Однако в клетках ороговевающего плоскоклеточного рака преджелудка крыс, по данным дот-гибридизации препаратов тотальной РНК с пробами *pBS-9* (*Na-gas*) и *pv-fos*, сигнал в препаратах карциномы и прилежащей слизистой оболочки оказался увеличенным в 2–3 раза. Этого эффекта не наблюдалось в метастазах опухоли (рис. 7). Иная картина обнаружена при исследовании экспрессии протоонкогена *c-fos* в индуцированной МННГ опухоли преджелудка крыс (см. рис. 7). В опухоли и прилежащей ткани эпителия транскрипция была снижена, а повышение ее отмечалось лишь в метастазе.

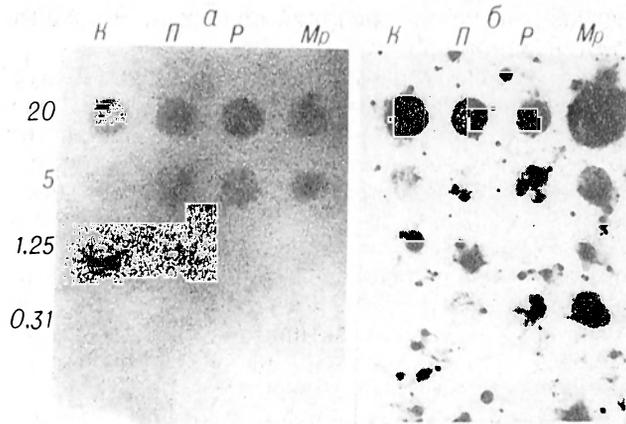


Рис. 7. Экспрессия: *Na-gas* (а) и *fos* (б) в раке преджелудка, индуцированного МННГ, у крыс.

Гибридизация в пятне препаратов тотальной клеточной РНК с пробой *pBS-9*. (а) и *pv-fos* (б). К — контроль; П — эпителий.

Изучение экспрессии митохондриальных (*mt*) генов осуществлялось с помощью пробы *mt B — A*, содержащей $2/3$ кольцевой молекулы *mt* ДНК, включенной в плазмиду *pBR* (рис. 8). В аденокарциномах желудка количество *mt* ДНК в 4–6 раз больше, чем в слизистой оболочке желудка крыс той же возрастной группы. В клетках рака преджелудка картина противоположная: установлено снижение количества *mt* ДНК.

Структуру рибосомальных генов в ДНК слизистой оболочки желудка крыс исследовали методом рестрикционного анализа. В качестве ДНК-пробы использовали фрагмент генома крысы (см. «Методику»), содержащий 3'-участок 18S рДНК, полный ген 5.8S рДНК, 5'-фрагмент 28S рДНК. Эта ДНК-проба при гибридизации с хромосомной ДНК крысы, гидролизованной *EcoRI*, выявляет специфический фрагмент 6,8 т. п. о. Было показано, что гибридуемость в 3–4 раза повышена в ДНК, выделенной из слизистой оболочки желудка крыс на 9-й день и 3-й месяц после начала введения МННГ, а также в сформированных аденокарциномах, индуцированных МННГ (рис. 9). Контролем служил материал 1,5-годовалых интактных крыс. Это указывает на амплификацию рибосомальных генов как в процессе канцерогенеза, так и в самой опухоли. Для того чтобы убедиться в этом, произвели повторную гибридизацию с пробой *pBS-9*, содержащей онкоген *vNa-gas* (см. рис. 9, б). Выделенная проба *vNa-gas* выявляла в геноме *EcoRI*-спе-

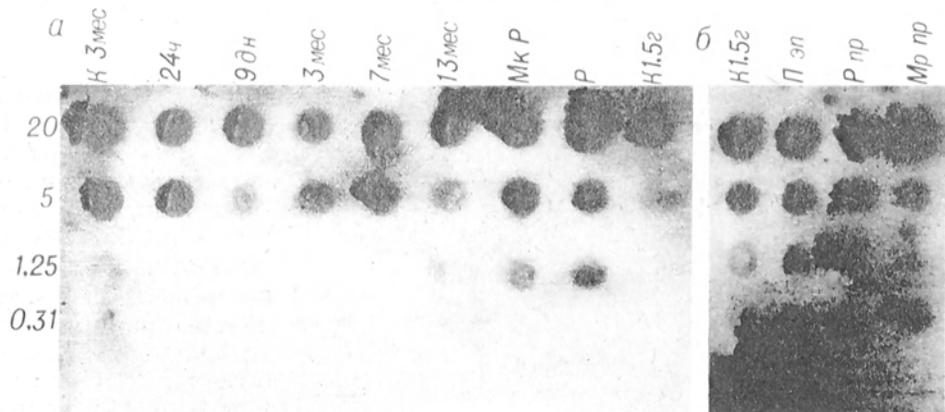


Рис. 8. Экспрессия *mt* ДНК в слизистой оболочке желудка (а) в динамике канцерогенеза и в преджелудке (б) крыс.

Гибридизация в пятне пробы *mt B — A* с препаратами тотальной клеточной РНК железистой части желудка (а) и преджелудка (б) крыс.

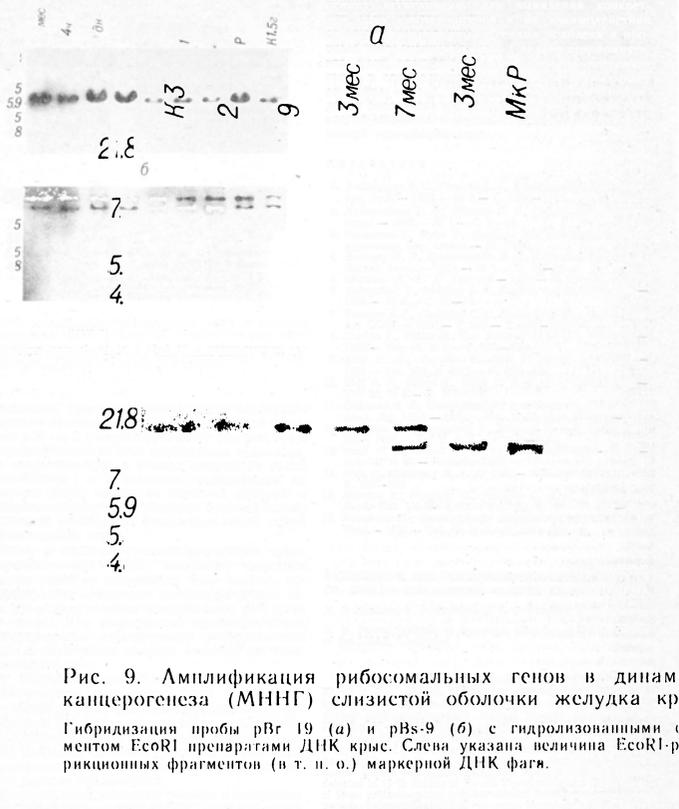


Рис. 9. Амплификация рибосомальных генов в динамике канцерогенеза (МННГ) слизистой оболочки желудка крыс. Гибридизация пробы pBg 19 (а) и pBs-9 (б) с гидролизованными ферментом EcoRI препаратами ДНК крыс. Слева указана величина EcoRI-рестриционных фрагментов (в т. п. о.) маркерной ДНК фага.

цифические фрагменты, содержащие последовательность протоонкогена Ha-gas 1 (верхний фрагмент) и Ha-gas 2 (нижний фрагмент) (см. рис. 9, б). Гибридизуемость во всех пробах была одинакова, что свидетельствует о равном количестве копий генов Ha-gas 1 и 2. В опытах, выполненных на образцах ДНК, взятых из опухолей желудка и неизменной слизистой оболочки больных людей, однако, не обнаружено увеличения числа копий рибосомальных генов.

Итак, в процессе гастроканцерогенеза крыс, индуцированного МННГ, экспрессия широкого спектра генов не изменяется. Рост опухоли сопровождается активацией митохондриальных генов. На ранних стадиях канцерогенеза (9-й день, 3-й месяц) и в развившихся аденокарциномах обнаруживается амплификация рибосомальных генов. В карциномах желудка человека это явление отсутствует.

В индуцированном МННГ плоскоклеточном ороговевающем раке преджелудка и прилежащем эпителии увеличено число транскриптов протоонкогена Ha-gas 1, однако этого не наблюдается в метастазах опухоли. Экспрессия протоонкогена c-fos, напротив, снижена в опухоли и увеличена в метастазах. Снижена также транскрипция mt генов в опухоли преджелудка.

Таким образом, выявлены отличия в экспрессии генов в индуцированном МННГ раке слизистой оболочки железистой части желудка от рака преджелудка крыс. Значение полученных результатов довольно сложно оценить. Требуется даль-

нейшее исследование для выявления конкретной роли протоонкогенов и их взаимодействия со специализированными генами человека в процессе гастроканцерогенеза. Следует подчеркнуть, что факт сложного взаимодействия протоонкогенов и специализированных генов не вызывает сомнения; на это, в частности, указывает подавление биосинтеза пепсиногена-пепсина [2] в слизистой оболочке желудка в процессе злокачественной трансформации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амбрумян Н. С., Татосян А. Г., Ениколопов Г. П. // Молекуляр. биол. — 1982. — № 6. — С. 1183—1187.
2. Калиновский В. П., Новиков Л. Б., Сейц И. Ф. // Экспер. онкол. — 1990. — № 1. — С. 6—11.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. — М., 1984.
4. Новиков Л. Б., Калиновский В. П., Князев П. Г. и др. // Экспер. онкол. — 1989. — № 1. — С. 18—21.
5. Новиков Л. Б. // Там же. — 1987. — № 1. — С. 18—21.
6. Новиков Л. Б., Федоров С. Н., Яцук О. С. и др. // Там же. — 1989. — № 5. — С. 66—70.
7. Татосян А. Г., Галецкий С. А., Киселева И. П. и др. // Докл. АН СССР. — 1983. — Т. 272. — С. 726—728.
8. Curran T., Peters G., Van Beveren N. et al. // J. Virol. — 1982. — Vol. 40, N 4. — P. 674—682.
9. Ellis R. W., De Feo D., Shih T. et al. // Nature. — 1981. — Vol. 292, N 5817. — P. 506—511.
10. Goff S. P., Gilboa E., Witte O. N. et al. // Cell. — 1980. — Vol. 22, N 3. — P. 777—785.
11. Gelmann E. P., Wong-Staal F., Kramer R. A. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78, N 11. — P. 3373—3377.
12. Georgiev O. I., Nasicov V. V., Braga E. A. et al. // Biochem. int. — 1984. — Vol. 8, N 2. — P. 225—229.
13. Reed K. S., Maun D. A. // Nucl. Acid Res. — 1985. — Vol. 13, N 20. — P. 7202—7221.
14. Shih C., Weinberg R. A. // Cell. — 1982. — Vol. 29, N 1. — P. 161—169.
15. Shimizu K., Goldfarb M., Parucho C. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 80, N 1. — P. 383—387.
16. Venstrom B., Moscovici C., Goodman H. M. et al. // Virol. — 1981. — Vol. 39, N 4. — P. 625—631.

Поступила 26.02.91

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR-BIOLOGICAL ASPECTS OF HUMAN AND ANIMAL GASTROCARCINOGENESIS

K. P. Khanson, V. P. Kalinovsky, L. B. Novikov, S. N. Fedorov
N. N. Petrov Institute of Oncology, Ministry of Public Health of the USSR, Leningrad

Expression of protooncogenes c-myc, N-myc, c-fos, Ha-ras 1, Ki-ras 2, yes, abl, src, N-ras, met and mos was studied in human gastric tumors and in rat gastric mucosal membrane during gastroduodenal carcinogenesis induced in rats by means of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNG). Elevated expression of protooncogenes c-myc, c-fos, Ha-ras 1, Ki-ras 2, N-myc and Raf 1 was observed in carcinomas of human stomach. Amplification of Ha-ras 1 protooncogene was found in the human gastric tumor and metastasis. Point mutation was not detected in 12th codone of Ha-ras 1 protooncogene. Expression of these protooncogenes was not altered during gastroduodenal carcinogenesis induced by MNG in rats. However, within early steps of cancerogenesis (9 days, 3 months) amplification of ribosomal genes occurred in rat gastric mucosal membrane and in adenocarcinoma developed, while the tumor growth was accompanied by activation of mitochondrial genes.

А. В. Васильев, Д. В. Гуткин, Т. Г. Данкова,
Т. А. Воробейчик, В. А. Тутельян

СОДЕРЖАНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ИНГИБИТОРОВ ТИОЛОВЫХ ПРОТЕИНАЗ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС

Институт питания АМН СССР, Москва

Внутриклеточные протеолитические ферменты играют важную роль в обеспечении различных физиологических процессов (эндоцитоз, деление клетки, процессинг синтезированных белков и т. д.) и повреждении клетки при патологических воздействиях [4]. Этим обусловлена необходимость существования надежных эндогенных механизмов регуляции активности протеиназ. Для большой группы протеиназ, имеющих в активном центре радикал цистеина (тиоловых протеиназ), таким механизмом является их обратимое ингибирование с помощью специфических ингибиторов белковой природы. Выделенные из различных объектов ингибиторы тиоловых протеиназ (ИТП) имеют гомологичные участки и относятся к единой суперсемье белков. В зависимости от своей молекулярной массы ИТП внутри этой суперсемьи подразделяются на кининогены (мол. м. 45—120 кДа), цистатины (мол. м. 13—14 кДа) и стефины (мол. м. около 11 кДа) [8]. Кининогены являются в основном внеклеточными, а цистатины и стефины — внутриклеточными ингибиторами.

За последние 10 лет ИТП были обнаружены в клетках различного происхождения (гепатоциты, миоциты, клетки почки, эпидермиса, нейтрофилы, макрофаги) и биологических жидкостях (кровь, лимфа, молозиво, сперма, амниотическая жидкость, слеза и т. д.) [3, 7, 9, 10, 13, 19—21]. В то же время внутриклеточное распределение ИТП между различными органеллами остается практически неизученным, хотя и представляет большой интерес в связи с широким распространением в клетке тиоловых протеиназ, имеющих различные свойства и выполняющих разные функции. Поскольку основным местом локализации тиоловых протеиназ является лизосомальный аппарат клетки, в котором обнаружены относящиеся к этой группе ферментов катепсины В, С, Н и L, можно предполагать, что лизосомы содержат большие количества специфических ИТП. На основании изложенного целью данной работы было выделение ИТП из лизосом и других субклеточных фракций гепатоцитов крыс и определение их ингибирующей активности в отношении лизосомальных тиоловых протеиназ — папаина.

Методика. Работа проведена на крысах-самцах линии Вистар. Животных декаантировали, печень промывали физиологическим раствором *in situ* и гомогенизировали в 0,25 М сахарозе в гомогенизаторе Поттера—Эльвейма (стекло/тефлон). Субклеточные фракции гепатоцитов выделяли методом дифференциального центрифугирования [11]. Для выделения ИТП использовали их свойство сохранять свою нативную структуру и растворимость при нагревании в кислой среде [12, 15]. В наших опытах полученные субклеточные

фракции (кроме цитозоля) разводили в 3 раза дистиллированной водой, доводили рН до 2,5—3,0 с помощью 6 н. HCl и прогревали в течение 10 мин при 80 °С. После охлаждения доводили рН до 6,0 с помощью 6 н. NaOH. Образовавшийся осадок денатурированных кислототермостойких белков удаляли центрифугированием при 100 000 г в течение 30 мин. В надосаде остаются кислототермостабильные белки (KTC-белки), в том числе ИТП.

ИТП выделяли из фракции KTC-белков методом аффинной колоночной хроматографии [7]. Аликвоту наносили на колонку (10×2 см), заполненную папаином, иммобилизованным на ВгCN-активированной сефарозе 4В в 0,02 М фосфатном буфере рН 6,0. Неспецифически связавшиеся белки элюировали 0,02 М фосфатным буфером рН 6,0, содержащим 0,4 М NaCl, а связавшиеся ИТП — 0,5 М фосфатным буфером рН 11,5.

Ингибиторная активность выделенных фракций KTC-белков и очищенных ИТП оценивалась по их способности подавлять активность тиоловых протеиназ: папаина (фирмы «Merck», Германия) и лизосомальных катепсинов В, С, Н и L. Источником лизосомальных протеиназ служила выделенная фракция лизосом. Активность папаина и катепсинов В, С, Н и L определяли спектрофлуориметрически с использованием в качестве субстратов KB3-Arg-β-нафтиламида, KB3-L-Arg-L-Arg-4-метокси-β-нафтиламида, Гли-Фен-β-нафтиламида, L-Arg-4-метил-кумарин-7-амида, KB3-L-Arg-4-метил-кумарин-7-амида соответственно [1, 2, 14]. При определении ингибиторной активности в реакционную смесь добавляли 0,1 мл фракции KTC-белков или ИТП. Содержание белка определяли методом [16]. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как видно из рис. 1, использованная нами методика аффинной колоночной хроматографии позволяет эффек-

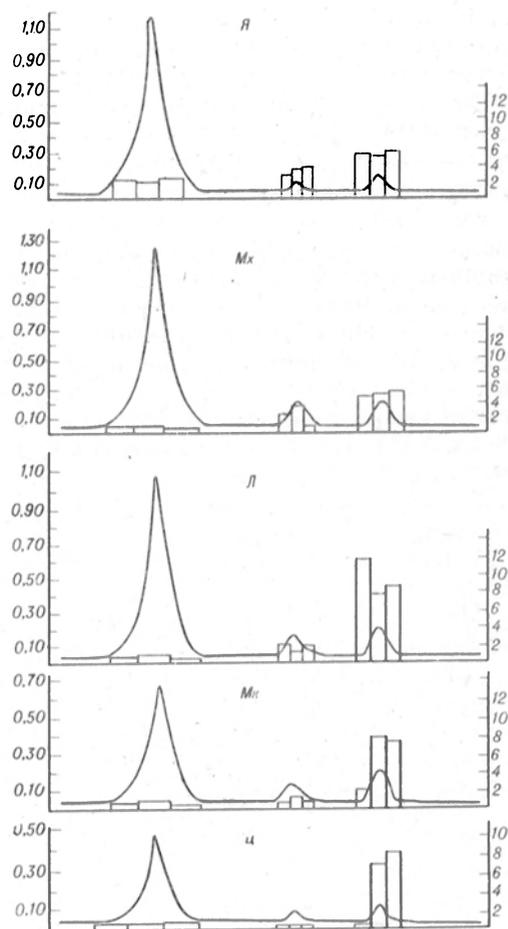


Рис. 1. Аффинная хроматография KTC-белков, выделенных из субклеточных фракций гепатоцитов крыс.

По осям ординат: слева — экстинкция при λ 254 нм, справа — ингибиторная активность по папаину, ед/мл. Я — ядерная, Мх — митохондриальная, Л — лизосомальная, Мк — микросомальная, ц — цитозольная фракция.

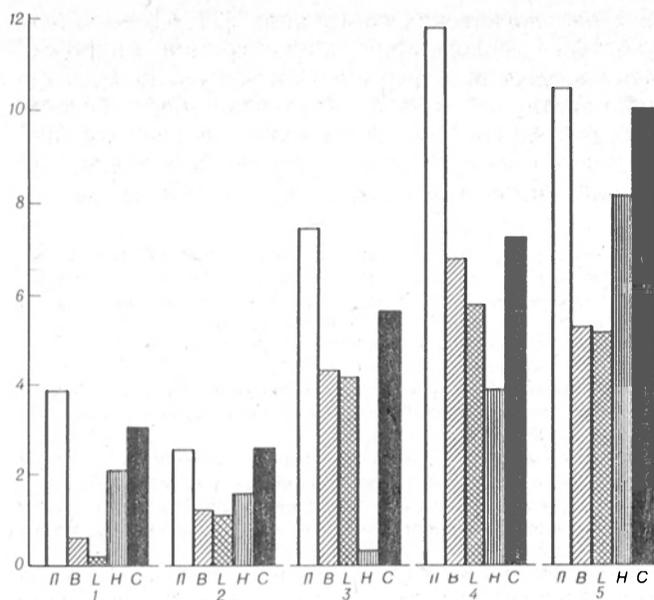


Рис. 2. Ингибиторная активность эндогенных ИТП в отношении различных тиоловых протеиназ.

По оси ординат — ингибиторная активность, ед/мг белка. 1 — ядерные, 2 — митохондриальные, 3 — лизосомальные, 4 — микросомальные, 5 — цитозольные ИТП. II — папаин; B, L, C — катепсины.

тивно выделять ИТП из субклеточных фракций гепатоцитов. Ингибиторная активность по папаину преимущественно связана с третьим ником хроматограммы. Видно также, что ИТП локализованы во всех отделах клетки, но наибольшее их содержание определяется в лизосомальной, микросомальной и цитозольной фракциях.

Тестирование внутриклеточных ИТП по их способности ингибировать активность лизосомальных тиоловых протеиназ (рис. 2) показало, что ИТП, выделенные из всех субклеточных фракций, проявляют наибольшее сродство к папаину и катепсину С. Ингибиторная активность в отношении других протеиназ неодинакова у ИТП из разных субклеточных фракций. Это, вероятно, свидетельствует о наличии в клетке множественных форм ИТП, локализованных в различных компартментах. Так же как и содержание ИТП, их наибольшая ингибиторная активность связана с лизосомальной, микросомальной и цитозольной фракциями. Обращает на себя внимание различная ингибиторная активность лизосомальных ИТП в отношении тиоловых протеиназ: они эффективно ингибируют катепсины В, L и С и малоактивны в отношении катепсина Н. Такие же закономерности обнаруживаются при исследовании микросомальных ИТП, что может свидетельствовать об идентичности или сходстве их с лизосомальными. Поскольку микросомальная фракция включает в себя элементы комплекса Гольджи (гладкие цитомембраны и пузырьки) и прелизосомы [6], можно думать, что высокое содержание ИТП в этой фракции обусловлено их накоплением в формирующихся лизосомах, где они специфически связываются с лизосомальными тиоловыми протеиназами во время процессинга и транспорта.

Цитозольные ИТП наиболее эффективно ингибируют активность папаина, катепсина С и Н, т. е.,

вероятно, представляют собой другую разновидность ИТП.

Таким образом, ИТП обнаружены во всех исследованных субклеточных фракциях. При этом места их преимущественной локализации соответствуют местам синтеза и накопления тиоловых протеиназ в клетке. Основными представителями этих ферментов являются кислые лизосомальные катепсины и нейтральные цитозольные Са-активируемые протеиназы. Лизосомальные тиоловые протеиназы выполняют в клетке важнейшие функции: участвуют в тотальном протеолизе ауто- и гетерофагоцитированных белков, осуществляют ограниченный протеолиз при созревании белков и т. д. [5]. Нейтральные Са-активируемые протеиназы в свою очередь обеспечивают изменение формы клетки, перемещение клеточных органелл, деградацию рецепторов и факторов роста, модификацию регуляторных ферментов [18]. Обратимое ингибирование этих ферментов с помощью эндогенных ИТП имеет, следовательно, для клетки большое значение и является важнейшим механизмом посттрансляционной регуляции их активности. При этом для нейтральных Са-активируемых протеиназ в цитозоле содержатся собственные специфические ингибиторы — кальпастатины, но они имеют значительно большую мол. м. (210—300 кДа) и другие параметры выделения. Можно достаточно уверенно полагать, что при выбранном методе выделения мы имеем дело с ИТП лизосом.

В целом проведенное исследование свидетельствует о том, что ИТП присутствуют в различных субклеточных фракциях гепатоцитов в соответствии с локализацией кислых тиоловых протеиназ и могут эффективно подавлять их активность. Однако остается открытым вопрос о возможности связывания проформ тиоловых протеиназ со специфическими ингибиторами в зоне аппарата Гольджи, так как имеются сведения, что неактивные проформы катепсинов В, Н и L, синтезируемые в эндоплазматическом ретикулуме, трансформируются в активные формы (в результате ограниченного протеолиза) в лизосомах [17]. Дальнейшие исследования содержания внутриклеточных ИТП при различных состояниях организма позволят выяснить их роль в регуляции клеточного метаболизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barrett A. Дж., Хит М. // Лизосомы: Методы исследования / Под ред. Дж. Дингла; Пер. с англ.— М., 1980.— С. 25—156.
2. Васильев А. В., Капелевич Т. А., Тугельян В. А. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 3.— С. 127—130.
3. Курпиченко Л. П., Шербак И. Г. // Укр. биохим. журн.— 1987.— № 1.— С. 31—33.
4. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты.— М., 1971.
5. Покровский А. А., Тугельян В. А. Лизосомы.— М., 1976.
6. Рид Э. // Цитология ферментов / Под ред. Д. Рудина; Пер. с англ.— М., 1971.— С. 23—27.
7. Anastasi A., Brown M. A., Kambhavi A. A., Nicklin M. J. H. // Biochem. J.— 1983.— Vol. 211.— P. 129—138.
8. Barrett A. // Biomed. biochim. Acta.— 1986.— Vol. 45.— P. 1363—1374.
9. Brzin J., Kopitar M., Turk V. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.— 1983.— Bd 364.— S. 1475—1480.
10. Brzin J., Jos K., Tnesenjак M., Machleidt W. // Biomed. biochim. Acta.— 1986.— Vol. 45.— P. 34—38.

11. De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R. et al. // *Biochem. J.*— 1955.— Vol. 60.— P. 604.
12. Jarvinen M., Rinne A. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1982.— Vol. 708.— P. 210—217.
13. Joronen I., Hopsu-Havu V. K., Manninen M. et al. // *J. immunol. Meth.*— 1986.— Vol. 86.— P. 243—247.
14. Kirschke H. // *Proteinases in Mammalian Tissues and Cells.*— Halle, 1982.— P. 125—128.
15. Linney J. F. // *Europ. J. Biochem.*— 1979.— Vol. 101.— P. 153—161.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
17. Nishimura Y., Kato K. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1987.— Vol. 148.— P. 254—259.
18. Pontremoli S., Melloni E. // *Ann Rev. Biochem.*— 1986.— Vol. 55.— P. 455—481.
19. Ritonja A., Kopitar M., Jerala R., Turk V. // *FEBS Lett.*— 1989.— Vol. 255.— P. 211—214.
20. Saito E., Kim H.-S., Smithies O., Maeda N. // *Gene.*— 1987.— Vol. 61.— P. 329—338.
21. Takio K. // *Biochem. biophys. Res. Commun.*— 1984.— Vol. 121.— P. 149—154.

Поступила 23.04.91

CONTENT OF ENDOGENOUS INHIBITORS OF THIOL-DEPENDENT PROTEINASES IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF RAT HEPATOCYTES

A. V. Vasil'ev, D. V. Gulkin, T. G. Dankova, T. A. Vorobeichik, V. A. Tutel'yan

Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A procedure for isolation of inhibitors of thiol-dependent proteinases was developed as well as distribution of the inhibitors in rat hepatocyte subcellular fractions was studied. The procedure involved separation of subcellular fractions by means of differential centrifugation, isolation of acid-thermostable proteins and their following purification using affinity chromatography on immobilized papain. The inhibitors were mainly localized in lysosomal, microsomal and cytosol fractions, whereas their specificity towards papain and lysosomal thiol-dependent proteinases cathepsins B, L, H and C was dissimilar, thus suggesting presence of various forms of inhibitors of thiol-dependent proteinases in these cell fractions.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 617.52-089.168-06:616-002.3-037-07: [616.152.3+616.153.96:577.112.554]-0.74

Ч. Р. Рагимов, Н. Ю. Касаганова, В. В. Захаров

МИКРОЭЛЕМЕНТЫ И СОДЕРЖАЩИЕ ИХ БЕЛКИ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ В ПРОГНОЗЕ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИЙ В ОБЛАСТИ ЛИЦА И ШЕИ

Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

При восстановлении дефектов и деформаций челюстно-лицевой области прогноз течения послеоперационных ран часто является неопределенным, что вынуждает хирургов проводить профилактику антибиотиками порой без учета индивидуального прогноза течения раневого процесса. Это снижает активность, а иногда и увеличивает число гнойно-воспалительных осложнений [8, 10].

По концентрации микроэлементов, уровню и ферментативной активности содержащих их белков в крови можно получить определенную информацию о биохимических процессах при различ-

ных патологических состояниях [1]. Цель нашей работы — исследование концентрации микроэлементов, уровня и ферментативной активности содержащих их белков при различных особенностях течения раневого процесса после операций в области лица и шеи с выявлением прогностической значимости обнаруженных изменений.

Методика. Нами проведено обследование 70 больных с дефектами и деформациями тканей челюстно-лицевой области, среди них 47 мужчин и 23 женщины, возраст от 17 до 60 лет, которым были произведены примерно равные по объему и травматичности пластические операции на мягких тканях. В послеоперационном периоде на 1, 3, 7 и 14-е сутки, т. е. в периоды, условно соответствующие фазам раневого процесса, проводили биохимические исследования сыворотки крови больных.

У 50 больных послеоперационный период протекал без осложнений, а у 20 больных (в основном на 3—5-е сутки) клинически были выявлены гнойно-воспалительные осложнения. Из исследования исключены больные с сопутствующими хроническими воспалительными процессами.

Содержание микроэлементов в сыворотке крови определяли методом эмиссионной спектроскопии с индукционной плазмой на спектрофотометре фирмы «Labtam» модели UV-25 и выражали в дегитах (единица интенсивности излучения элемента). Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по методике [6], основанной на способности фермента ингибировать реакцию восстановления нитросинего тетразолия супероксид-анион-радикалом. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли в сопряженной глутатион-глутатионредуктазной системе с использованием гидроксид-кумола в качестве субстрата [9]. Церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТР) определяли по относительной концентрации их в образцах сыворотки крови и оценивали по амплитуде электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) ($g=4,3$ и $2,056$ для ТР и ЦП соответственно [2]). Спектры измеряли при 77К на радиоспектрометре ЕР-220D в комплектации с ЭВМ «Аспект-200» («Вгисег», Германия).

Абсолютные показатели выражали в процентах, при этом за 100% принимали результаты обследования каждого отдельного больного за 24 ч до операции.

Результаты и обсуждение. Существенные сдвиги концентрации отдельных микроэлементов, изменение уровня и активности белков, с которыми они связаны, свидетельствуют о включении регуляторных процессов в период заживления послеоперационных ран. В ходе исследования обнаружены однотипные изменения ряда показателей крови. Во все сроки наблюдения при различных особенностях течения раневого процесса имелись положительная и достоверная корреляция изменения показателей содержания меди и ЦП. При неосложненном течении (рис. 1) содержание меди и ЦП повысилось в 1-е сутки после операции, что рассматривают как защитный фактор [7]. Постепенно повышается и активность другого медьсодержащего белка — СОД — одного из основных антиоксидантных ферментов. При гнойно-воспалительных осложнениях повышенная травматизация и инфицированность оперированных тканей приводят к накоплению окисленных метаболитов в крови [3], что, возможно, сдерживает адекватную адаптационную реакцию организма. Так, на 1—3-и сутки снижалось содержание меди и ЦП в крови, в то же время СОД активировалась в этих условиях (см. рис. 1). На 7-е сутки, по-видимому, в результате включения резервных механизмов содержания меди и ЦП повысилось, а активность СОД понизилась.

Способность ионов железа связываться с ТР, выполняющего транспортную функцию, позволяет этому металлу участвовать во внутриклеточных

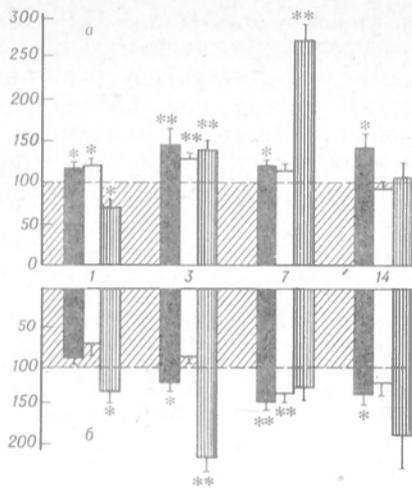


Рис. 1. Изменение содержания меди, уровень ЦП и активность СОД в сыворотке крови больных, перенесших операции на мягких тканях лица и шеи.

Темные столбики — ЦП; светлые столбики — медь; столбики с вертикальной штриховкой — СОД. Здесь и на рис. 2 и 3: косая штриховка — исходные величины, принятые за 100%. Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$ по сравнению с исходной величиной; по осям абсцисс — срок после операции, сут; по осям ординат — концентрации микроэлементов, активность металлоферментов и содержание металлопротеинов, % к исходной величине. *а* — неосложненное течение. *б* — гнойно-воспалительные осложнения раневого процесса.

процессах. В 1-е сутки после операции практически у всех больных понизилось общее содержание железа и ТР в крови. При неосложненном течении раневого процесса (рис. 2) за счет высвобождения железа из внутриклеточных депо содержание металла в крови на 3-и сутки после операции достоверно превышает дооперационный уровень. В то же время повышается насыщение железом ТР. Причиной увеличения содержания железа может служить также повышение концентрации в крови гаптоглобина и гемопексина — белков плазмы, связывающих и переносящих освобождающиеся в области раневого дефекта гемоглобин, так как в эти сроки интенсивно идут процессы деструкции эритроцитов. Понижение концентрации железа на 7-е сутки при неосложненном течении, очевидно, свидетельствует о возникновении временного дефицита металла в организме. Уровень ТР продолжает повышаться, достигая исходных величин; появляется возможность связать все свободное железо и транспортировать его в клетки. При гнойно-воспалительных осложнениях (см. рис. 2) содержание же-

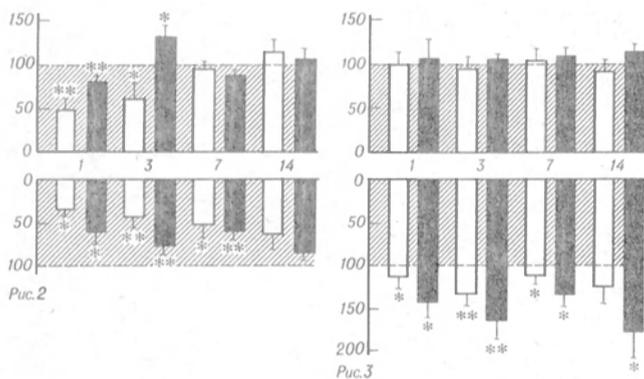


Рис. 2. Изменение содержания железа и уровень ТР.

Светлые столбики — железо, темные столбики — ТР.

Рис. 3. Изменение содержания селена и активность ГПО. Светлые столбики — селен; темные столбики — ГПО.

леза и ТР в крови понижено. Накопление в крови при нагноительных процессах окисленных метаболитов препятствует насыщению железом ТР [5], в связи с чем даже небольшие концентрации железа, находясь в несвязанном состоянии, поддерживают окислительные процессы в тканях [7].

В настоящее время высокая биологическая активность соединений селена общепризнана [11]. Интерес к селену вызван тем, что один из антиоксидантных мембранно-защитных ферментов — ГПО, который предотвращает накопление окисленных метаболитов в крови, является селеносодержащим [4]. При неосложненном течении послеоперационных ран (рис. 3) содержание селена в крови существенно не изменилось. Не выявлено также достоверного изменения активности ГПО во все сроки наблюдения. При гнойно-воспалительных осложнениях (см. рис. 3) содержание селена достигает пика на 3-и сутки. Резкая активация ГПО также приходится на 1—3-и сутки, что может свидетельствовать о взаимосвязанных изменениях уровня селена и активности ГПО как системы антиоксидантной защиты в ответ на накопление окисленных метаболитов в крови.

Таким образом, изменения содержания микроэлементов, уровня и ферментативной активности связанных с ними белков при гнойно-воспалительных осложнениях существенно отличаются от соответствующих показателей при неосложненном течении раневого процесса, что можно использовать в диагностических целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабенко Г. А. Микроэлементы в экспериментальной и клинической медицине. — Киев, 1965.
2. Ингерм Д. Электронный парамагнитный резонанс в биологии. — М., 1972.
3. Мамедов Л. А., Захаров В. В., Рагимов Ч. Р. и др. // Бюл. exper. биол. — 1988. — № 6. — С. 686—689.
4. Петрович Ю. А., Подорожная Р. И. // Успехи соврем. биол. — 1981. — Т. 91, № 1. — С. 127—144.
5. Рагимов Ч. Р., Касаганова Н. Ю., Сергеев Ю. П. и др. // Стоматология. — 1991. — № 1. — С. 12—14.
6. Beauchamp Ch., Fridovich I. // Analyt. Biochem. — 1971. — Vol. 44. — P. 276—287.
7. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. // Molec. Aspects. Med. — 1985. — Vol. 8. — P. 89—193.
8. Johnstone F. // Surg. Gynec. Obstet. — 1963. — Vol. 116, N 1. — P. 1—10.
9. Little C., Clinescu R., Reid K. G., O'Brien P. J. // J. biol. Chem. — 1970. — Vol. 245, N 14. — P. 3632—3636.
10. Sundusky W. R. // Surg. Clin. N. Amer. — 1980. — Vol. 60, N 1. — P. 83—92.
11. Tarp U., Overvad K., Thorling E. B et al. // Scand. J. Rheum. — 1985. — Vol. 14. — P. 364—368.

Поступила 23.05.90

PROGNOSIS OF PYO-INFLAMMATORY COMPLICATIONS DEVELOPED AFTER SURGICAL OPERATIONS OF CERVI-COFACIAL REGION USING EVALUATION OF TRACE ELEMENTS AND METALLOPROTEINS IN BLOOD SERUM;

Ch. R. Ragimov, N. Yu. Kasaganova, V. V. Zakharov I. M. Sechenov Medical Academy, Moscow

Concentration of trace levels of cuprum, ferrum and selenium as well as activity of superoxide dismutase and content of ceruloplasmin and transferrin were studied in blood serum of 70 patients with defects and deformations of cervicofacial region before and after surgical plastic operations approximately similar in their size and the rate of traumatic injury. Alterations in content of the trace elements as well as in content and activity of the metalloenzymes, observed during pyoinflammatory complications, were considerably distinct from these patterns detected in noncomplicated wound inflammation; the patterns studied may be used for prognostic purposes.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1991

УДК 614.3:632.954]-074

С. А. Еремин, И. Ю. Морева, Б. Б. Дзангиев,
А. М. Егоров, М. Франек

**ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕРБИЦИДА
2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ
МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛЮОРО-
ИММУНОАНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
АНАЛИЗАТОРА TDx ФИРМЫ «АВБОТТ LAB-
BORATORIES»**

Московский университет им. М. В. Ломоносова, Институт ветеринарии, Брно, ЧСФР

Контролю за загрязнением различными пестицидами продуктов питания, почвы, водоемов и т. д., и в частности гербицидами, уделяется все большее внимание. Однако применяемые в настоящее время для определения гербицидов методы газовой или жидкостной хроматографии [6] и радиоиммуноанализа [2, 4] довольно длительные по времени и требуют большой пробоподготовки образца.

Данная статья посвящена разработке экспресс-методики поляризационного флюороиммуноанализа одного из наиболее часто используемых гербицидов — 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Принцип поляризационного флюороиммуноанализа описан ранее в ряде обзоров [1, 7]. Вкратце, метод основан на конкурентном взаимодействии определяемого антигена и антигена, меченного флюоресцентной меткой (трасера), за ограниченное количество антител и измерении степени поляризации реакционной смеси. Поляризация флюоресценции меченого антигена в растворе имеет небольшое значение и значительно возрастает при образовании иммунного комплекса с антителами. Чем выше концентрация определяемого антигена в пробе, тем в большей степени меченый антиген в реакционной смеси будет в свободном состоянии и ниже значение поляризации флюоресценции. Данный метод анализа гомогенный и позволяет определять концентрацию антигена в течение нескольких минут. К преимуществам поляризационного флюороиммуноанализа следует также отнести простоту выполнения анализа, точность, хорошую воспроизводимость результатов, стабильность калибровочной кривой. Ограничением широкого применения этого метода является недостаточное количество приборов для измерения поляризации флюоресценции.

Методика. Для проведения синтеза и разработки метода анализа использовали химические реактивы отечественного (марки о. с. ч. и х. ч.) и импортного («Sigma») производства. 0,95 г тетрабората натрия и 1 г азида натрия растворяли в 1 л дистиллированной воды; рН буфера 9,2. Готовили стандарты 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты путем разбавления исходного раствора гербицида в этаноле (1 г/л) до конечных концентраций 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 и 100 мкг/мл. К 4 мг (20 мкмоль) раствора 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в 1 мл диметилформамида добавляли

4 мг (40 мкмоль) N-гидроксисукцинимида и 16 мг (80 мкмоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 2 ч и добавляли 5 мг (10 мкмоль) этилендиаминфлюоресцеинитокарбамата [3]. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем отгоняли в вакууме органический растворитель и остаток растворяли в 0,5 мл метанола и хроматографировали на пластинках «Силуфол» в системе этилацетат — метанол — уксусная кислота в отношении 60:15:1 (по объему). С пластинки собирали основную желтую полосу с R_f 0,4 и экстрагировали полученную 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту, меченную флюоресцеином, в 2 мл метанола. Для приготовления рабочей концентрации 100 мкл полученного раствора трасера разбавляли 3 мл 0,01 М карбонатного буфера рН 9,6, после чего спектрофотометрически определяли концентрацию трасера при длине волны 492 нм и по коэффициенту экстинкции флюоресценца $8,78 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} / \text{см}^{-1}$ [3].

Затем этот раствор разбавляли до концентрации 10 нмоль/л боратным буфером рН 9,2 и использовали в анализе, описанном ниже: При разработке анализа мы использовали антисыворотку с наибольшим титром антител, полученную при иммунизации кроликов конъюгатом 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и бычьим сывороточным альбумином. Для измерения поляризации флюоресценции мы использовали анализатор TDx фирмы «Abbott» (США). Исследования проводили в полуавтоматическом режиме по программе «Photo Check».

В стеклянную кювету к 50 мкл анализируемой пробы или стандарта добавляли 0,5 мл раствора 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, меченного флюоресцеином, в концентрации 10 нмоль/л и 0,5 мл антисыворотки, разбавленной в соотношении 1:200 буфером для анализа. Загружали 10 кювет в карусель для выполнения теста «Photo Check» на анализаторе TDx фирмы «Abbott» и измеряли поляризацию флюоресценции в автоматическом режиме. Время анализа 10 образцов около 7 мин.

Результаты и обсуждение. Чувствительность любого метода иммуноанализа существенно зависит от специфичности и аффинности используемых антител. Проведя скрининг антисывороток против 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты методом поляризации флюоресценции, мы выбрали антисыворотку от одного из подопытных животных (рис. 1). Титр антисыворотки, определенный этим методом при 50 % связывания трасера, превышал 1/1000.

При проведении оптимизации метода определения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты мы проварьировали объем образца, время проведения анализа, концентрацию трасера и степень разведения антисыворотки. На рис. 2 представлены калибровочные графики определения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты при различных разведениях антисыворотки. По мере разведения антисыворотки калибровочные графики смещаются почти параллельно, поэтому можно использовать антисыворотку в широком диапазоне разведений. Для дальнейших исследований мы выбрали разведение 1/200. Причем следует отметить, что для проведения анализа можно использовать цельную антисыворотку, а не ее иммуноглобулиновую фракцию, как обычно делается в иммуноферментном или радиоиммунном анализе. С увеличением объема анализируемого образца пропорционально увеличивается и чувствительность анализа. Мы брали 50 мкл образца для анализа, что обеспечивало достаточную чувствительность и широкий диапазон определяемых концентраций

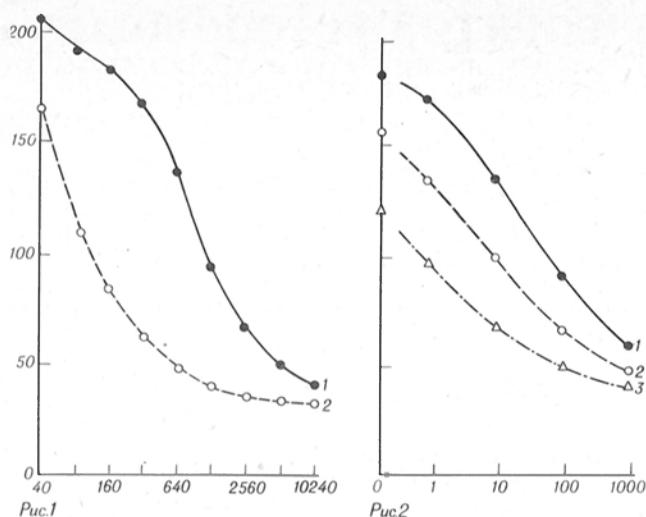


Рис. 1. Кривые разбавления антисыворотки против 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (1) и нормальной неиммунной сыворотки кролика (2).

По оси абсцисс — разведение антисыворотки; по оси ординат — поляризация флуоресценции, мР.

Рис. 2. Влияние степени разведения антисыворотки на калибровочные кривые для поляризационного флюороиммуноанализа 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты.

Разведение антисыворотки 1:100 (1), 1:200 (2), 1:400 (3). По оси абсцисс — концентрация 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, мкг/мл; по оси ординат — поляризация флуоресценции, мР.

2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Калибровочный график поляризационного флюороиммуноанализа 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты показан на рис. 3. Разработанный метод анализа гомогенный, равновесие в системе устанавливается практически сразу при смешении реагентов. Поляризационный флюориметр ТДх фирмы «Abbott» (США) позволяет определять по программе «Photo Check» в автоматическом режиме до 10 образцов одновременно. Общее время определения 10 образцов составляет около 7 мин.

Выполнив 10 повторных измерений нулевого стандарта и используя метод расчета Родбарда [5], при 95 % уровне достоверности мы нашли, что минимальная определяемая концентрация 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты составила 0,1 мкг/мл. Объем образца для анализа составляет 50 мкл, поэтому методом поляризационного иммуноанализа можно определить 5 нг гербицида в пробе, т. е. по чувствительности опре-

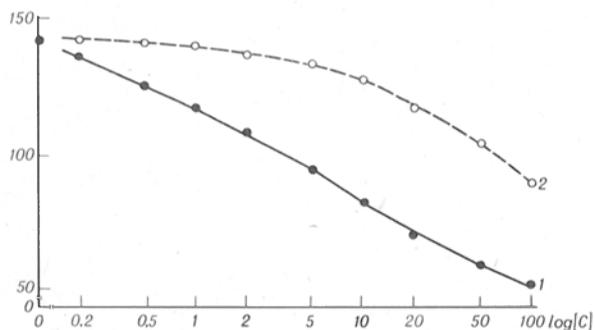


Рис. 3. Калибровочная кривая для поляризационного флюороиммуноанализа 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (1) и перекрестная реакция с гербицидом 2-метил-4-хлорфеноксиуксусной кислоты (2).

По оси абсцисс — концентрация гербицида, мкг/мл; по оси ординат — поляризация флуоресценции, мР.

Перекрестные реакции (в %) различных соединений при определении 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты методом поляризационного флюороиммуноанализа

Соединение	Перекрестные реакции при концентрации 10 мкг/мл
2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота	100
2,4,5-Трихлорфеноксиуксусная кислота	59
4-(2,4-Дихлорфенокси)масляная кислота	41
4-(2-Метил-4-хлорфенокси)масляная кислота	12
2-Хлорфеноксиуксусная кислота	7,7
2-Метил-4-хлорфеноксиуксусная кислота	7,2
2-Метил-4,6-дихлорфеноксиуксусная кислота	2,6
2-(2,4-Дихлорфенокси)пропионовая кислота	2,5
2-(2-Метил-4-хлорфенокси)пропионовая кислота	1,0
2-Метилфеноксиуксусная кислота	1,0
2-Метил-6-хлорфеноксиуксусная кислота	0,3

деления данный метод превосходит метод жидкостной хроматографии [6] и сравним с радиоиммуноанализом [4].

Для оценки воспроизводимости результатов анализа мы провели анализ 3 контрольных образцов, содержащих 1, 10 и 100 мкг/мл 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в 4—10 повторях в одном анализе. Средние значения концентраций гербицида, найденные по калибровочной кривой, составили 0,98, 10,5 и 110,3 мкг/мл 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты с коэффициентами вариации 13,1, 6,3 и 1,4 % соответственно. Коэффициенты вариации концентраций тех же образцов стандартов по результатам трех анализов в разные дни были равны 17,7, 15,1 и 8,3 % соответственно.

Определяя специфичность анализа, мы исследовали перекрестные реакции с различными гербицидами и структурноподобными соединениями для 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высокой специфичности анализа (см. таблицу). Максимальные значения перекрестного реагирования для близкородственных соединений 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты и 4-(2,4-дихлорфенокси) масляной кислоты (которые встречаются в виде примеси в выпускаемой промышленностью 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте) составляют 59 и 41 % соответственно. Перекрестная реакция другого широко используемого пестицида — 2-метил-4-хлорфеноксиуксусной кислоты — составляет всего 7,2 %, что позволяет достоверно количественно определять 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту в присутствии гербицидов или других соединений.

В заключение следует отметить, что разработанный метод поляризационного флюороиммуноанализа прост, быстр и надежен. Он может быть использован для массового экспресс-контроля концентрации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в экстрактах из различных источников для целей охраны окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

- Бекберженов Б. М., Житников В. Г. // Антибиотики. — 1988. — Т. 33. — С. 16—18, 72—76.
- Клорр Д., Нунн Р., Добберкау Н.-J. // Arch. Toxicol. — 1985. — Vol. 58. — P. 27—32.

3. Pourfarzaneh M., White G. W., Landon J., Smith D. S. // Clin. Chem.—1980.— Vol. 26.— P. 730—733.
 4. Rinder D. F., Fleeker J. R. // Bull. environ. Contam. Toxicol.—1981.— Vol. 26.— P. 375—380.
 5. Rodbard D. // Analyt. Biochem.—1978.— Vol. 90.— P. 1—12.

6. Smith A. E., Hayden B. J. // J. Chromatogr.—1979.— Vol. 171.— P. 482—485.
 7. Smith D. S., Al-Hekieem M. H. H., Landon J. // Ann. clin. Biochem.—1981.— Vol. 18.— P. 253—274.

Поступила 23.04.91

СОДЕРЖАНИЕ

Материалы Всесоюзного симпозиума «Биохимия опухолевой клетки», Минск, ноябрь 1990 г.

Збарский И. Б. Особенности клеточного ядра опухолевых клеток	2
Гельштейн В. И. Применение моноклональных антител к белкам промежуточных филаментов цитоскелета в диагностике опухолей человека	4
Нестерова М. В. Онкологические аспекты действия циклических нуклеотидов	11
✓ Локишина Л. А. Протеолитические ферменты в процессах онкогенеза	15
Дятловицкая Э. В. Гликофинголипиды и злокачественный рост	21
Бердинских Н. К. Полиамины и опухолевой рост	23
Боровицкая А. Э., Евтушенко В. И., Хансон К. П. Действие пренатального нейтронного облучения на экспрессию генов в развивающемся мозге крысы	25
✓ Былинкина В. С., Голубева Н. В., Гуреева Т. А., Локишина Л. А., Полянская А. М., Самойлова Р. С. Активность протеиназ в лимфоидных клетках при разных формах лимфопролиферативных заболеваний	30
Горбачева Л. Б., Гудцова К. В., Дедерер Л. Ю., Соколова И. С., Сибельдина Л. А., Шкарин П. Ю. Изменения в аппарате репликации и состоянии пула фосфорсодержащих метаболитов экспериментальных опухолей животных в процессе развития	33
✓ Дилакян Э. А., Соловьева И. И., Тополь Л. З. Исследование цистеиновых протеиназ на разных этапах онкогенной трансформации фибробластов крысы	36
Забойкин М. М., Алехина Р. П., Лихтенштейн А. В. Анализ явления компарментализации генома в нормальных и опухолевых клетках	39
Карелин А. А. Роль «сигнального» АТФ как вторичного мессенджера в трансмембранной передаче полипептидных сигналов к росту и клеточной дифференцировке	44
Корнева Е. Н., Шербakov В. М., Кравченко Л. В., Чиквашвили Б. Ш., Девиченский В. М., Семенов С. Ю., Летыгин В. П. Сравнительное исследование эффективности классической и модифицированной схем Купера при химиотерапии рака молочной железы	47
Курченко В. П., Исмахил И., Пронская И. В. Роль канцерогенных аминобифенилов в дифференцировке гепатоцитов	50
Мазуренко Н. Н., Коган Е. А., Сухова Н. М., Зборовская И. Б. Синтез и распределение онкобелков в опухолевых тканях	53
Морозкина Т. С., Суколинский В. Н., Стрельников А. В. Избирательное влияние комплекса витаминов Е, А, С на антиоксидантную защиту опухолевых и нормальных тканей	59
Москалева Е. Ю., Гроздова И. Д. Содержание сАМР, активность протеинкиназ и структура ДНК в покое и пролиферирующих лимфоцитах периферической крови и в клетках Т-лимфомы человека	62
Никифорова И. Ф., Максимишина М. Г., Лемехов В. Г., Князев П. Г. Роль конститутивных особенностей и перестроек онкогена HRAS1 в развитии рака легкого человека	64
Пикuleв А. Т., Оrel Н. М., Кукулянская М. Ф., Мохорева С. И., Филимонов М. М., Хрипченко И. П., Черногузов В. М. Комбинированное влияние гипергликемии с химио- и лучевым воздействием на состояние метаболических процессов в некоторых экспериментальных саркомах крысы	68
Самонина Г. Е., Нацвлишвили Н. А., Ашмарин И. П.	

CONTENTS

Proceedings of the All-Union Symposium «Biochemistry of Tumor Cell», Minsk, November 1990

Zbarsky, I. B. Characteristics of tumor cell nuclei	2
Gelshtein, V. I. Use of monoclonal antibodies to cytoskeleton tumors filament intermediate proteins in the diagnosis of human	4
Nesterova, M. V. Oncological aspects of the action of cyclic nucleotides	11
Lokshina, L. A. Proteolytic enzymes in oncogenesis	15
Dyatlovitskaya, E. V. Glycosphingolipids and malignant growth	21
Berdinskikh, N. K. Polyamines and tumor growth	23
Borovitskaya, A. E., Evtushenko, V. I., Hanson, K. P. Effect of prenatal neutron irradiation on gene expression in developing rat brain	25
Bylinkina, V. S., Golubeva, N. V., Gureeva, T. A., Lokshina, L. A., Polyanskaya, A. M., Samoylova, R. S. Activity of proteinases in lymphoid cells of patients with various lymphoproliferative disorders	30
Gorbacheva, L. B., Goodtsova, K. V., Dederer, L. Yu., Sokolova, I. S., Sibeldina, L. A., Shkarin, P. Yu. Alterations in the replication apparatus and in the phosphorus-containing metabolites pool during growth of tumors in animals	33
Dilakyan, E. A., Solov'yova, N. I., Topol, L. Z. Cysteine-dependent proteinases at various steps of rat fibroblast malignant transformation	36
Zaboikin, M. M., Alekhina, R. P., Lichtenstein, A. V. On the phenomenon of genome compartmentalization in normal and tumoral cells	39
Karelin, A. A. Importance of signal ATP as a secondary messenger of transmembrane transduction of polypeptide signal to cell growth and differentiation	44
Korneva, E. N., Scherbakov, V. M., Kravchenko, L. V., Chikvashvili, B. Sh., Devichensky, V. M., Semenov, S. Yu., Letyagin, V. P. Efficiency of routine and modified Cuper procedures used in chemotherapy of mammary gland tumor	47
Kurchenko, V. P., Ismakhil, I., Pronskaya, I. V. Effects of carcinogenic aminobiphenyls on hepatocytes differentiation	50
Mazurenko, N. N., Kogan, E. A., Sukhova, N. M., Zhorovskaya, I. B. Synthesis and distribution of oncoproteins in tumoral tissues	53
Morozkina, T. S., Sukolinsky, V. N., Strel'nikov, A. V. Selective effect of vitamins E, A and C complex on the antioxidation system in normal and tumoral tissues	59
Moskaleva, E. Yu., Grozdova, I. D. Content of cAMP, activity of protein kinases and DNA structure in resting and proliferating lymphocytes of peripheral blood and in human T-lymphoma cells	62
Nikiforova, I. F., Maximishina, M. G., Lemekhov, V. G., Knyazev, P. G. Role of constitutional peculiarities and rearrangement of HRAS1 oncogene in development of human lung cancer	64
Pikulev, A. T., Orel, N. M., Kukulyanskaya, M. F., Mikhoreva, S. I., Filimonov, M. M., Khripchenko, I. P., Chernoguzov, V. M. Simultaneous effect of hyperglycemia, chemo- and X-ray therapy on metabolism of some rat sarcomas	68
Samonina, G. E., Natsvlishvili, N. A., Ashmarin, I. P.	

- Антиульцерогенное (лечебное и профилактическое) свойство одного из психостимуляторов фенилалкилсид-нониминового ряда 72
- Суханов В. А., Морозова Л. Ф., Лалаев В. В., Яхъяев А. В., Дьяков В. Л. Ингибирование пролиферации меланоцитарных клеток человека MS и BPO α -меланоцитстимулирующим гормоном 73
- Сяткин С. П., Березов Т. Т., Гридина Н. Я., Бундюк Л. С., Ковалишин Я. Ф. Полиамины как биохимические маркеры антипролиферативного действия ингибиторов ферментов биосинтеза полиаминов и путресцина в культуре ткани L-клеток 77
- Ушакова Н. А., Власова А. Л., Преображенская М. Е., Самойлова Р. С., Полянская А. М., Григорьева М. А., Байдулин С. А. Гликозидазы лимфоидных клеток при разных формах лимфопролиферативных заболеваний 78
- Федоров С. Н., Балански Р. М., Новиков Л. Б., Леванова Г. И., Лихачев А. Я., Анисимов В. Н., Хансон К. П. Исследование митохондриальной ДНК печени крыс, обработанных 1,2-диметилгидразином 82
- Хансон К. П., Калиновский В. П., Новиков Л. Б., Федоров С. П. Биохимические и молекулярно-биологические аспекты гастроканцерогенеза у человека и животных 84
- Антиульцерогенное, куративное и защитное, эффекты одного из психостимулянтов from phenylalkyl sydnonimine series
- Sukhanov, V. A., Morozova, L. F., Lalaev, V. V., Yakhyaev, A. V., D'yakov, V. L. Inhibition of human melanoma cells MS and BPO proliferation by means of α -melanocyte stimulating hormone
- Syatkin, S. P., Berezov, T. T., Gridina, N. Ya., Bundyuk, L. S., Kovalishin, Ya. F. Antiproliferative effect of polyamines and putrescine and their use as biochemical markers of the biosynthesis rate in L-cell culture
- Ushakova, N. A., Vlasova, A. L., Preobrazhenskaya, M. E., Samoylova, R. S., Polyanskaya, A. M., Grigoryeva, M. A., Baydurin, S. A. Glycosidases of lymphoid cells in patients with different forms of lymphoproliferative disorders
- Fedorov, S. N., Balansky, R. M., Novikov, L. B., Levanova, G. I., Likhachev, A. Ya., Anisimov, V. N., Khanson, K. P. Properties of mitochondrial DNA from liver tissue of rats treated with 1,2-dimethyl hydrazine
- Khanson, K. P., Kalinovskiy, V. P., Novikov, L. B., Fedorov, S. N. Biochemical and molecular-biological aspects of human and animal gastrocancerogenesis
- Васильев А. В., Гуткин Д. В., Данкова Т. Г., Воробейчик Т. А., Тутельян В. А. Содержание эндогенных ингибиторов тиоловых протеиназ в субклеточных фракциях гепатоцитов крыс 89
- Рагимов Ч. Р., Касаганова Н. Ю., Захаров В. В. Микроэлементы и содержащие их белки сыворотки крови больных в прогнозе гнойно-воспалительных осложнений после операций в области лица и шеи 91
- Vasil'ev, A. V., Gutkin, D. V., Dankova, T. G., Vorobeichik, T. A., Tutel'yan, V. A. Content of endogenous inhibitors of thiol-dependent proteinases in subcellular fractions of rat hepatocytes
- Ragimov, Ch. R., Kasaganova, N. Yu., Zakharov, V. V. Prognosis of pyo-inflammatory complications developed after surgical operations of cervicofacial region using evaluation of trace elements and metalloproteins in blood serum
- Фирма «Эбботт Лэбораториз» сообщает:**
- Еремин С. А., Морева И. Ю., Дзантиев Б. Б., Егоров А. М., Франек М. Экспресс-определение гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты методом поляризационного флюориммуноанализа с использованием анализатора ТДх фирмы «Abbott Laboratories» 93
- Abbott Laboratories Firm Informs**
- Eremin, S. A., Moreva, I. Yu., Dzantiev, B. B., Egorov, A. M., Franek, M. Rapid determination of herbicide of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using polarization fluoroimmunoassay with TDx analyzer designed by «Abbott Laboratories»

Адрес редакции журнала:

Москва, 109801, Солянка, 14

АМН СССР

тел. 297-16-44

Зав. редакцией Э. А. Половинко

Редактор К. И. Кочкарёна.
Технический редактор Л. И. Жучкова.

Художественный редактор Н. И. Корюкова.
Корректор Л. П. Тарарина.

Сдано в набор 20.08.91. Подписано в печать 27.09.91. Формат 60×88/8. Печать офсетная. Усл. печ. л. 11,76.
Усл. кр. отт. 12,25. Уч. изд. л. 14,02. Тираж 995. Заказ 6267. Цена 3 р.

Ордена Трудового Красного Знамени
Издательство «Медицина» Москва 101000. Петровригский пер. 6/8

Набрано на ордена Трудового Красного Знамени
Чеховском полиграфическом комбинате
Государственной ассоциации предприятий
объединений и организаций
полиграфической промышленности «АСПОЛ»
142300, г. Чехов Московской области

Отпечатано в Подольском филиале ПО «Периодика»
142110, г. Подольск, ул. Кирова, 25