

С.Я. Жанаева, Т.А. Алексеенко, Г.А. Шкурат, Т.А. Короленко

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ И АКТИВНОСТЬЮ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ В ТКАНИ ЛИМФОСАРКОМЫ LS МЫШЕЙ

ГУ НИИ физиологии СО РАМН

ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск

Исследовали влияние противоопухолевых препаратов циклофосфана (ЦФ) и нитрозометилмочевины (НММ) на активность цистеиновых протеаз катепсинов В и L в ткани опухоли у мышей с перевиваемой экспериментальной лимфосаркомой LS. Показано, что действие препаратов сопровождается повышением в опухоли активности катепсинов В и L, причем как противоопухолевый эффект, так и повышение активности ферментов при использовании ЦФ существенно выше, чем НММ. Высказано предположение, что наблюдаемые различия связаны с индукцией ЦФ апоптоза клеток использованной опухоли.

Ключевые слова: мышцы, лимфосаркома LS, циклофосфан, нитрозометилмочевина, цистеиновые протеазы катепсины В и L, апоптоз

Лизосомальные цистеиновые протеазы катепсины В и L принадлежат семейству папаин-подобных протеаз. Они обнаружены в лизосомах большинства клеток организма и относятся к белкам домашнего хозяйства [6]. Основная функция катепсинов В и L — внутрилизосомальная деградация белков; кроме того, показано их участие в деградации внеклеточных белков — ламинина, фибронектина, коллагена IV типа [14, 19], а также в активации посредством ограниченного протеолиза других ферментов — активатора плазминогена урокиназного типа, некоторых металлопротеиназ и др. [19]. В связи с тем, что разрушение белков базальных мембран и окружающих опухоль тканей является определяющим условием инвазии и миграции опухолевых клеток, катепсины В и L, наряду с металлопротеазами, аспартильными и сериновыми протеазами, рассматриваются в качестве ферментов, в значительной степени обеспечивающих процессы инвазии и метастазирования опухолей [6, 12, 15, 19].

Результаты многолетних исследований показали, что цистеиновые протеазы лизосом играют весьма значительную роль в механизмах роста злокачественных опухолей [6, 8, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 19]. Обнаружено, что в тканях ряда злокачественных опухолей в отличие от интактных повышены концентрация и активность цистеиновых и аспартильных протеаз лизосом [8, 17, 18, 19], изменен уровень их внутри- и внеклеточных ингибиторов, увеличена секреция протеаз во внеклеточную среду [17, 18]. У человека описано увеличение активности катепсинов В, L и D в тканях

карциномы груди [8], опухолей легкого [19], желудка, прямой кишки [18], головы и шеи [10, 17].

Прогрессия опухолей в ряде случаев сопровождается повышением содержания и активности цистеиновых протеаз лизосом катепсинов В и L в ткани опухоли и сыворотке крови больных [8, 10, 18]. Обнаружена прямая корреляционная зависимость между концентрацией и активностью катепсина В в клетках карциномы прямой кишки и их инвазивным потенциалом [18], концентрацией катепсинов В и L в клетках карциномы головы и шеи и карциномы желудка и наличием метастазов в регионарных лимфоузлах [17, 18].

С другой стороны, получены данные об участии цистеиновых протеаз в реализации различных программ клеточной гибели — апоптоза, некроза, апонекроза [16]. Показано, что катепсин В необходим для реализации индуцированного при помощи TNF- α или оксидативного стресса апоптоза гепатоцитов мыши, кардиомиоцитов, фибробластов или клеток фибросаркомы [9, 15]. Предполагают, что катепсины лизосом участвуют в активации каспаз — главных участников апоптоза [11, 15].

В настоящей работе исследовали влияние противоопухолевых препаратов циклофосфана (ЦФ) и нитрозометилмочевины (НММ) с различной противоопухолевой эффективностью относительно экспериментальной лимфосаркомы LS мышей на активность цистеиновых протеаз катепсинов В и L в ткани опухоли.

Клетки лимфосаркомы LS, как показано в работах В.И. Каледина и соавт. [1, 5], проявляют

относительно низкую чувствительность к действию гамма-излучения, комплексных соединений платины, нитрозометилмочевины (НММ), адриамицина и исключительно высокую чувствительность к ЦФ. Действие ЦФ на LS реализуется, главным образом, через апоптоз ее клеток [1, 5]. НММ, согласно литературным данным, обладает циклонеспецифической генотоксической активностью, основным механизмом противоопухолевого действия НММ является алкилирование нуклеиновых кислот и белков [4].

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 4-месячных мышках-самцах линии СВА весом 25-30 г, полученных из вивария ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН г. Томска. Эксперименты проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08 1977 г. №755). Животных содержали по 8-9 особей в клетке при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище (гранулированный комбикорм ПК 120-1 ООО «Лабораторснаб» (Москва) для лабораторных крыс и мышей, сбалансированный по а/к составу, минеральным веществам и витаминам). Использованная в работе опухоль была получена и любезно предоставлена нам ст. н. с. В.И. Калединым (Институт цитологии и генетики СО РАН) [2]. Асцит, содержащий опухолевые клетки, извлекали из брюшной полости мышей, разводили физиологическим раствором в 10 раз и по 0,1 мл суспензии, содержащей $1-2 \cdot 10^6$ клеток, трансплантировали животным в мышцы правого бедра. Циклофосфан (ЦФ, АО «Биохимик», Саранск) и нитрозометилмочевину (НММ) растворяли в изотоническом растворе NaCl и вводили животным однократно внутривентрально в дозах 50 мг/кг или 150 мг/кг на 10 сутки после перевивки опухолей. Через трое суток после лечения животных забивали методом декапитации. По разнице веса задней конечности с опухолью и контралатеральной конечности вычисляли вес опухоли. Противоопухолевый эффект препаратов оценивали по степени торможения роста опухоли, которую рассчитывали по формуле: $[(M_{\text{контр.}} - M_{\text{опыт.}}) / M_{\text{контр.}}] \times 100\%$, где $M_{\text{опыт.}}$ — среднее значение массы опухоли у животных данной группы, $M_{\text{контр.}}$ — среднее значение массы опухоли в группе контрольных животных.

Печень, селезенку и опухоль извлекали, гомогенизировали в 0,25М растворе сахарозы pH 7,2 и в гомогенатах определяли активность катепсинов В и L по методу Barrett, Kirschke. В качестве субстратов использовали соответственно Z-L-Phe-L-Arg-MCA и Z-L-Arg-L-Arg-MCA (Sigma, USA),

для определения активности катепсина L — применяли селективный ингибитор катепсина В СА-074 (любезно предоставленный проф. К. Hanada, Япония). Флюоресценцию растворов определяли при помощи флюоресцентного спектрофотометра «Perkin Elmer 650-10S»; результаты выражали в нмоль метилкумариламида (МКА) / мин на мг белка. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В наших предварительных экспериментах однократное введение ЦФ в дозе 50 или 150 мг/кг мышам с опухолью LS вызывало регрессию опухоли у 100% животных. Обратное развитие опухолевых имплантатов начиналось на 2-е сутки после лечения, а на 6-е сутки опухоли переставали пальпироваться. В настоящей работе торможение роста опухоли на 3-и сутки после введения ЦФ в дозе 50 и 150 мг/кг составило 75 и 81% соответственно. Введение НММ мышам с LS приводило к непродолжительной (в течение 2 суток) задержке роста трансплантатов опухоли, а начиная с 3 суток, когда масса последних составляла примерно половину (точнее 51%) таковой в контроле, их рост возобновлялся и в дальнейшем шел с такой же скоростью, как у контрольных животных.

Активность катепсинов В и L в печени мышей с опухолью при лечении ЦФ и НММ не изменялась, в селезенке она в обоих случаях увеличивалась 1,5-2 раза (Таблица). Что касается ткани опухолей, то применение как ЦФ, так и НММ приводило к повышению в ней активности катепсинов В и L (Рис. 2). Максимальное повышение активности ферментов — катепсина В в 5,8 раз, а катепсина L в 20 раз — выявлено в опухолевых тканях у мышей, получавших ЦФ в дозе 150 мг/кг с наиболее значительным снижением массы опу-

Таблица
Влияние ЦФ (50 и 150 мг/кг, в/б) и НММ (150 мг/кг, в/в) на активность катепсинов В и L в печени и селезенке мышей с лимфосаркомой LS

Группы животных	Катепсин В, мкмольМСА/мин на г белка	Катепсин L, мкмольМСА/мин на г белка
Печень		
Контроль	0,91 ± 0,078	0,66 ± 0,035
ЦФ, 50мг/кг	0,86 ± 0,021	0,63 ± 0,035
НМ, 150 мг/кг	0,96 ± 0,041	0,83 ± 0,098
Селезенка		
Контроль	1,27 ± 0,112	0,11 ± 0,011
ЦФ, 50мг/кг	2,08 ± 0,162**	0,12 ± 0,006
НМ, 150 мг/кг	2,76 ± 0,111*** P2-3 < 0,01	0,16 ± 0,007** P2-3 < 0,01

Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем (не лечеными мышами).

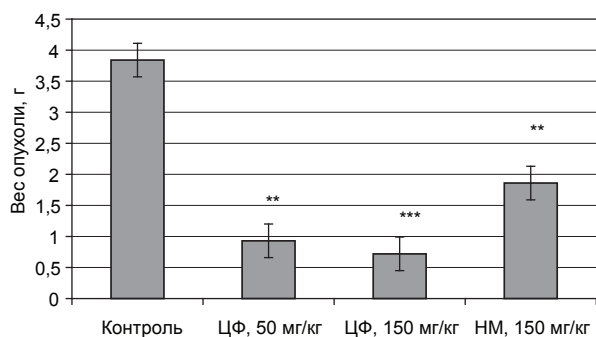


Рис. 1. Влияние ЦФ (50 и 150 мг/кг, в/б) и НММ (150 мг/кг, в/в) на массу чувствительной к апоптогенному действию ЦФ LS
** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой (не лечеными мышами)

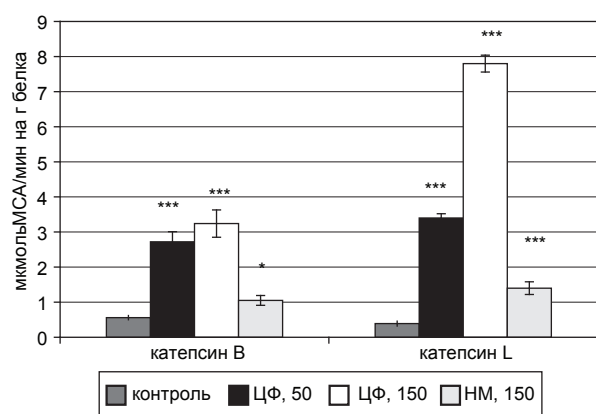


Рис. 2. Влияние ЦФ (50 и 150 мг/кг, в/б) и НММ (150 мг/кг, в/в) на активность катепсинов В и L в ткани LS
* — $p < 0,05$, *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем

холи (Рис. 1, 2). В опухолях со средними показателями торможения роста (при лечении ЦФ в дозе 50 мг/кг) активность катепсина В увеличилась в 4,8 раз, а катепсина L — в 8,7 раз. Наименьшее повышение активности ферментов (катепсина В — в 1,8 раз, а катепсина L — в 3,6 раз) выявлено в ткани опухолей мышей, леченных НММ (Рис. 1, 2).

Таким образом, полученные данные показывают, что воздействие ЦФ или НММ, приводящее к регрессии или торможению роста опухоли LS у мышей, сопровождается повышением активности цистеиновых протеаз катепсинов В и L в ткани опухоли, причем степень увеличения активности этих ферментов пропорциональна величине терапевтического эффекта. Нельзя исключить, однако, что в случае с НММ незначительное увеличение в опухолях активности изучаемых протеаз не является результатом относительно низкого противоопухолевого эффекта препарата, а связано с иным, по сравнению с ЦФ, механизмом его терапевтического действия. Показано, что ЦФ вызывает регрессию лимфосаркомы LS, индуцируя массивный апоптоз ее клеток [1, 5]; что

касается НММ, то механизм действия этого генотоксического препарата на клетки данной опухоли не изучался.

Возникает вопрос: насколько закономерно повышение активности катепсинов В и L в ткани опухоли при ее успешном лечении и каковы клеточные источники этого повышения? Существует мнение, что активация цистеиновых протеаз важна для инициации и/или осуществления апоптотической гибели клеток [2], которая имеет место в лимфосаркоме LS при действии ЦФ. В литературе описаны примеры повышения активности катепсина В [9, 11, 16] и аспартильной протеазы катепсина D [16] в нормальных и опухолевых клетках в состоянии апоптоза. Однако поскольку в наших экспериментах активность протеаз определялась в гомогенатах опухоли, нельзя утверждать, что она увеличивалась именно в опухолевых клетках. Очевидно, источником увеличения активности протеаз могли быть тканевые макрофаги и лимфоциты, в массе инфильтрирующие опухоль, находящиеся в состоянии апоптоза или некроза. В нашей лаборатории ранее было показано повышение активности катепсинов В и L в ткани опухоли мышей с лимфосаркомой LS при воздействии относительно низких доз циклофосфана — 50 мг/кг, что рассматривали как последствия притока макрофагов в ткань опухоли при эффективной терапии [3, 13]. Этот вопрос требует специального изучения. Однако каким бы ни был механизм повышения активности протеаз в ткани опухоли при терапевтическом воздействии, ее величина может, очевидно, рассматриваться как определенный показатель эффективности лечения.

INVESTIGATION OF CONNECTION BETWEEN EFFICACY OF ANTI-TUMORAL THERAPY AND ACTIVITY OF MICE CYSTEINE PROTEASES IN LYMPHOSARCOMA LS TISSUE

S.Ya. Zhanaeva, T.A. Alekseenko, G.A. Shkurat, T.A. Korolenko

Cysteine proteases were shown to involve into tumor progression and metastases development as well as in apoptosis of tumor cells during treatment (cathepsin B). Effect of anti-tumor drugs cyclophosphamide (CPA) and nitrozomethylurea (NMM) on the activity of cysteine proteases cathepsins B and L in tumor tissue of mice with transplantable experimental lymphosarcoma LS was investigated. It was shown that both agents studied increased cathepsins B and L activity in tumor tissues, but effect of CPA on cysteine proteases in tissue of lymphosarcoma LS was much more significant compared to the NMM. It was proposed that remarkable increase of cathepsins B and L activity in tumor tissue during CPA treat-

ment was connected with induction of apoptosis in lymphosarcoma LS cells by CPA.

Литература

1. Апоптоз индуцирующая и противоопухолевая эффективность циклофосфана, платина и адриамицина при их раздельном применении и в комбинации у мышей с лимфосаркомой LS / В.П. Николин, В.И. Каледин, Т.Ю. Баймак и др. // *Вопр. онкологии.* — 2002. — Т. 48. — № 2. — С. 211-215.
2. Влияние ингибитора цистеиновых протеаз Ер-475 на ФНО- α -независимый апоптоз клеток мышинной лимфосаркомы LS, индуцированный циклофосфаном / С.Я. Жанаева, Т.А. Короленко, О.М. Хощенко и др. // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* — 2005. — № 5. — С. 153-156.
3. Регуляция активности цистеиновых протеаз: роль предшественников протеаз (проферментов) и внутриклеточных ингибиторов / Т.А. Короленко, С.Я. Жанаева, О.Н. Потеряева и др. // *Бюл. СО РАМН.* — 2004. — № 2. — С. 130-134.
4. Таксотер и нитрозометилмочевина — экспериментальная оценка совместного применения / Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова и др. // *Вопр. онкологии.* — 1999. — № 4. — С. 429-433.
5. Циклофосфамид индуцированный апоптоз клеток мышинной лимфосаркомы в условиях *in vivo* / В.И. Каледин, И.П. Николин, Т.А. Агеева и др. // *Вопр. онкологии.* — 2000. — Т. 46. — С. 588-593.
6. Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity / V. Turk, I. Dolenc, B. Lenac et al. // *Eur. J. Biochem.* — 1999. Vol. 259. — P. 926-932.
7. Barrett A.J. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L / A.J. Barrett, H. Kirschke // *Methods Enzymol.* — 1981. — Vol. 80. — P. 535-561.
8. Cathepsin B a prognostic indicator in lymph node-negative breast carcinoma patients: comparison with cathepsin D, cathepsin L and other clinical indicators / T.T. Lah, M. Cercek, A. Blejek et al. // *Clin. Cancer Res.* — 2000. — Vol. 6. — P. 578-584.
9. Cathepsin B act as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor / L. Forghsgaard, D. Wissing, D. Mauch et al. // *Cell Biol.* — 2001. — Vol. 153. — № 5. — P. 999-1010.
10. Cathepsin B immunohistochemical staining in tumor and endothelial cells is a new prognostic factor for survival in patients with brain tumors / T. Strojnik, J. Kos, B. Zidanik et al. // *Clin. Cancer Res.* — 1999. — Vol. 5. — P. 559-567.
11. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small lung cancer cells / L. E. Bröker, C. Huisman, S. W. Span et al. // *Cancer Res.* — 2004. — Vol. 64. — P. 27-30.
12. Cysteine cathepsins are central contributors of invasion by cultured adenosylmethionine decarboxylase-transformed rodent fibroblasts / K. Ravanko, K. Järvinen, J. Helin et al. // *Cancer Res.* — 2004. — Vol. 64. — P. 8831-8838.
13. Cysteine proteases and inhibitors in murine tumors during effective treatment by cyclophosphamide and macrophage stimulators / T.A. Korolenko, O.V. Falameyeva, O.N. Poteryaeva et al. // *Anticancer Res.* — 2002. — Vol. 22. — P. 4301-4303.
14. Degradation of extracellular matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumor tissues / M. R. Buck, D. G. Karustis, N. A. Day et al. // *J. Biochem.* — 1992. — Vol. 282. — P. 273-277.
15. Effective tumor cell death by σ -2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress / M.S. Ostefeld, N. Fehrenbacher, M. Hoyer-Hansen et al. // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65. — P. 8975-8983.
16. Fehrenbacher N. Lysosomes as targets for cancer therapy / N. Fehrenbacher, M. Jäättelä // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65. — P. 2993-2995.
17. Prognostic significance of cysteine proteases cathepsins B and L and their endogenous inhibitors stefins A and B in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck / P. Strojnik, M. Budihna, L. Smid et al. // *Clin. Cancer Res.* — 2000. — Vol. 6. — P. 1052-1062.
18. Prognostic significance of DNA ploidy, S-phase fraction and tissue levels of aspartic, cysteine and serine proteases in operable gastric carcinoma / A. Russo, V. Bazan, M. Migliavacca et al. // *Clin. Cancer Res.* — 2000. — Vol. 6. — P. 178-184.
19. Szpadarska A.M. An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer / A.M. Szpadarska, A. Frankfater // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61. — P. 3493-3500.