

лена. Кровотечение из периферического отрезка сосуда было умеренным. Произведена тугая тампонада марлевым тампоном полости под основанием черепа. Гистологическое исследование: хемотектома. В послеоперационном периоде центральной неврологической симптоматики не отмечено. Явления паралича каудальной группы черепно-мозговых нервов гомолатеральной стороны углубились. Подтягивание тампона начало на 7-й день. Полностью тампон удален к 11 марта 1991 г. Самочувствие в послеоперационном периоде оставалось удовлетворительное, глотание не нарушено, голос не изменился. Медикаментозного воздействия на свертывающую систему крови не проводилось. Показатели коагулограммы оставались в пределах нормы.

Таким образом, длительное сдавление внутренней сонной артерии опухолью и уменьшение ее калибра благоприятствовало благополучному исходу операции при таком грозном осложнении. Больной повторно осмотрен в феврале 1992 г. Признаков рецидива и метастазов не обнаружено. Признаков поражения центральной нервной системы нет. Симптоматика развернутого каудального паралича справа сохраняется, однако глотание компенсировано. В феврале 1992 г. проведен курс восстановительной логотерапии, в результате которого наладилось фонационное дыхание и стал более звучным голос.

© Коллектив авторов, 1994
УДК 616. 33-006-612. 32:577.17

*А. Л. Канцалиев, Н. Е. Куштинский, А. В. Васильев,
А. А. Клименков*

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ И В НЕ ПОРАЖЕННОЙ ОПУХОЛЬЮ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА

НИИ клинической онкологии

Интерес к изучению протеолитических ферментов объясняется их высокой биологической активностью, участием в защитных реакциях организма, процессах роста и деления клеток [1, 6]. Значительное число исследований посвящено изучению протеиназ в тканях злокачественных опухолей. За последние несколько лет были достигнуты определенные успехи в изучении механизмов метастазирования злокачественных опухолей. В частности, была доказана связь нескольких групп протеолитических ферментов с процессами инвазии и метастазирования меланомы, рака молочной железы, яичников и шейки матки, колоректальной карциномы, рака поджелудочной железы [2, 5, 8, 15]. При этом большинство авторов обнаружили высокую активность протеолитических ферментов в злокачественных новообразованиях вышеперечисленных органов по сравнению с не пораженной опухолевым процессом тканью.

Особое внимание исследователей привлекает изучение цистеиновых протеиназ — катепсина В и L, а также аспартильной протеиназы — катепсина D, секретируемых клетками злокачественных новообразований и принимающих участие в механизмах разрушения экстрацеллюлярного матрикса окружающих опухоль клеток, тем самым облегчая опухолевую инвазию и метастазирование [9, 11].

nerves aggravated. Tampon pulling out started on day 7. The tampon was completely removed on March 11th, 1991. The patient's postoperative condition remained satisfactory, swallowing was not disturbed, the voice did not change. No medicamentation was performed for the blood coagulating system. Coagulogram parameters were within the normal limits.

Thus, the long-term compression of the internal carotid artery by the tumor and the narrowing of its calibre contributed to the favorable resolution of this very severe complication. The patient underwent second examination in February 1992. There was no evidence of disease recurrence or metastases. There was no evidence of affection of the central nervous system either. The symptoms of the caudal right-side paralysis were still observed. In February 1992 the patient had a course of rehabilitative logotherapy resulting in normalization of the phonational respiration and the patient's voice became more sonorous.

Поступила 17.11.92 / Submitted 17.11.92

*A. L. Kantsaliev, N. E. Kushlinsky, A. V. Vasiliev,
A. A. Klimenkov*

A COMPARATIVE STUDY OF PROTEINASE ACTIVITY IN MALIGNANT NEOPLASMS AND GASTRIC MUCOSA NOT AFFECTED BY THE TUMOR

Research Institute of Clinical Oncology

The interest to proteolytic enzymes is determined by their high biological activity, participation in protective reactions of the body, processes of cellular growth and division [1, 6]. There are many investigations of proteinase activity in tissue of malignant neoplasms. Over the recent years there has been a certain progress in study of mechanisms of malignant tumor metastasis. In particular, some groups of proteolytic enzymes have been shown to contribute to invasion and metastasis of melanoma, breast, ovarian and cervical cancers [2, 5, 8, 15]. Most investigators point out to high activity of proteolytic enzymes in the malignant neoplasms mentioned above as compared with tissue not affected by the neoplastic disease.

Special attention of investigators is drawn by cysteine proteinases, such as cathepsins B and L, and by an aspartic proteinase, cathepsin D, secreted by cells of malignant neoplasms, which participate in mechanisms of destruction of extracellular matrix of cells surrounding the tumor, thus facilitating tumor invasion and metastasis [9, 11].

There is no direct evidence of contribution of proteinases secreted by malignant tumors to metastasis so far. However, several investigations [10, 13, 14] have discovered increased activity of proteolytic enzymes in tumors with considerable metastatic and invasive potentials.

Прямых доказательств участия протеиназ, секретруемых злокачественными опухолями, в процессах метастазирования в настоящее время не получено. Однако исследования, проведенные рядом авторов [10, 13, 14], обнаружили повышение активности протеолитических ферментов в опухолях, обладавших значительной способностью к метастазированию и инвазивному росту.

Так, М. Watanabe и соавт. [16], изучавшие активность цистеиновых протеиназ при раке желудка, отметили положительную зависимость между активностью катепсина В в опухоли и ее инвазивной способностью.

При анализе доступной нам литературы не было найдено сообщений по изучению активности аспартильных протеиназ в злокачественных новообразованиях желудка.

Цель настоящего исследования — изучение активности катепсинов В, L и D в первичных опухолях желудка с учетом основных клинико-морфологических характеристик опухоли.

Материалы и методы. Исследованы образцы опухолей и не пораженной опухолью слизистой оболочки желудка у 42 пациентов (22 мужчины и 20 женщин) с распространенностью процесса, соответствующей T0—4 N0—2 M0—1 стадии заболевания. Возраст больных, от 39 до 78 лет.

После хирургического удаления опухоли из препарата выделяли фрагмент опухоли, не пораженную опухолью слизистую оболочку соответствующего анатомического отдела желудка и лимфатический узел. Клинический диагноз у всех больных подтвержден данными гистологического исследования опухоли.

Из полученных образцов тканей готовили гомогенаты по общепринятой методике [3].

Определение активности катепсина D проводили спектрофотометрическим методом А. Barret и соавт. [4] с использованием в качестве субстрата гемоглобина («Sigma», США).

Определение активности катепсина В проводили спектрофлуориметрическим методом [2]. Субстрат — N-бензоил-DL-аргинин-нафтилаид («Serva», Германия).

Определение активности катепсина L проводили спектрофлуориметрическим методом Н. Kirshke и соавт. [7]. Субстрат — CBZ-phearg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США).

Результаты и обсуждение. Уровни активности катепсинов В и D в опухолях колебались в широких пределах: от 34,4 до 581,8 пмоль/мин на 1 мг белка для катепсина В, 6,08—360,7 нмоль/мин на 1 мг белка для катепсина D. Активность катепсина L в опухолях была также неоднородной — от 9,8 до 181,8 пмоль/мин на 1 мг белка.

Средние показатели активности катепсина D в опухолях были в 1,5 раза выше активности фермента в не пораженной опухолью процессом слизистой желудка. Активность катепсина В в опухолях в 2,7 раза превышала активность фермента в образцах непораженной слизистой оболочки желудка. Для катепсина L данное соотношение составило 1,9 раза. Представленные различия в активности вышеуказанных ферментов в опухоли и интактной слизистой оболочке статистически достоверны ($p < 0,01$ для катепсинов В и L, $p < 0,02$ для катепсина D).

У 69% обследованных больных были выявлены метастазы в регионарных лимфатических узлах. При оценке активности протеиназ в лимфатических узлах отмечены следующие особенности: активность катепсина D в пораженных метастазами лимфатических узлах была в 2 раза выше, чем в лимфатических узлах, не пораженных опухолью процессом. Данные различия были статистически значимыми ($p < 0,02$). Активность катепсинов В и L в лимфатических узлах с гистологически подтвержденным метастатическим поражением была несколько ниже активности ферментов в интактных лимфатических узлах (табл. 1).

For example, M. Watanabe et al. [16] studied cysteine proteinase activity in gastric cancer and established a positive correlation of cathepsin B activity in the tumor and its invasive potential.

We have failed to find reports on activity of aspartile proteinases in gastric malignancies in the literature available.

The purpose of this investigation was to study activity of cathepsins B, L and D in primary gastric tumors with respect to basic clinical and biological characteristics of the tumor.

Materials and Methods. The investigation was performed on specimens of tumors and intact mucosa taken from 42 patients (22 males and 20 females) with stage T0—4N0—2M0—1 disease. The patients' age was ranging from 39 to 78 years.

After surgical removal of the lesion a tumor fragment, a piece of mucosa from the corresponding anatomical site of the stomach not affected by the tumor and a lymph node were isolated from the specimens. The clinical diagnosis in all the cases was confirmed histologically.

The specimens were further processed to obtain homogenates according to common techniques [3].

Cathepsin D activity was evaluated by spectrophotometry according to the technique of A. Barret et al. [4] using hemoglobin (Sigma, USA) as substrate.

Cathepsin B activity was evaluated by spectrofluorimetry according to the technique of H. Kirshke et al. [7] using CBZ-phearg-7-amido-4-methylcoumarin (Sigma, USA) as substrate.

Results and Discussion. Activity of cathepsins B and D was ranging greatly from 34.4 to 581.8 pmol/min per mg protein (cathepsin B) and from 6.08 to 360.7 nmol/min per mg protein (cathepsin D). Cathepsin L activity was also varying from 9.8 to 181.8 pmol/min per mg protein.

Mean values of cathepsin D activity in the tumors were 1.5-fold higher than those in gastric mucosa not affected by the tumor. Cathepsin B activity in the tumors was 2.7-fold greater than the enzyme activity in the intact mucosal specimens. The respective ratio for cathepsin L was 1.9. The differences in the activities of the enzymes in the tumor and in the intact mucosa were statistically significant ($p < 0.01$ for cathepsins B and L, $p < 0.02$ for cathepsin D).

Regional lymph node metastases were detected in 69% of the patients under study. The study of proteinase activity in lymph nodes discovered the following: cathepsin D activity in metastatic lymph nodes was twice as great as that in intact lymph nodes, the difference being statistically significant ($p < 0.02$). Cathepsins B and L activities in lymph nodes with histologically confirmed metastasis were somewhat lower than those in intact lymph nodes (table 1).

There were mainly two morphological tumor types, i.e. adenoma and carcinoma *simplex mucocellulare*, found by histology. Analysis of cysteine proteinases in different histological tumor types showed higher enzyme activity levels in some of the adenocarcinomas as compared to the carcinoma *simplex mucocellulare*, while mean values of the enzyme activities in the two tumors types under study were practically the same 228.8 ± 45.3 and 183.3 ± 37.3 pmol/min per mg protein for cathepsin B, and 69.5 ± 6.7 and 53.0 ± 8.4 pmol/min per mg protein for cathepsin L. Cathepsin D activity also showed a tendency to increase in the carcinomas *simplex mucocellulare* (175.1 ± 31.5 nmol/min per mg protein) as compared to mean values of cathepsin D activity in the adenocarcinomas (158.7 ± 13.9 nmol/min per mg protein). However, these differences were not statistically significant.

Taking into account structural and functional peculiarities of epithelial cells in different sections of the stom-

При гистологическом исследовании злокачественных новообразований желудка в основном выявлены два морфологические варианта опухолей — аденокарцинома и карцинома simplex mucosellulare. При анализе активности цистеиновых протеиназ в различных гистологических вариантах опухолей отмечены более высокие уровни ферментативной активности в некоторых аденокарциномах по сравнению с таковыми показателями в карциноме simplex mucosellulare, однако средние уровни активности изученных ферментов не различались в двух гистологических вариантах опухолей и равнялись $228,8 \pm 45,3$ и $183,3 \pm 37,3$ пмоль/мин на 1 мг белка для катепсина В; $69,5 \pm 6,7$ и $53,0 \pm 8,4$ пмоль/мин на 1 мг белка для катепсина L. Показатели активности катепсина D также имели тенденцию к повышению в карциноме simplex mucosellulare ($175,1 \pm 31,5$ нмоль/мин на 1 мг белка) в сравнении со средними показателями активности катепсина D в аденокарциномах ($158,7 \pm 13,9$ нмоль/мин на 1 мг белка). Однако эти различия были статистически недостоверными.

Особенности строения и регуляции функции эпителиальных клеток в различных анатомических отделах желудка обусловили изучение активности протеолитических ферментов с учетом локализации опухоли в исследуемом органе.

Нами обнаружено, что средние показатели активности катепсина D в образцах интактной слизистой оболочки проксимального и антрального отделов желудка были достоверно выше, чем в слизистой оболочке тела ($p < 0,05$). Различия в активности катепсинов В и L в непораженной слизистой оболочке различных анатомических отделов желудка оказались статистически незначимыми (табл. 2).

Во всех анатомических отделах желудка средние показатели ферментативной активности в опухоли были выше, чем в не пораженной опухолевым процессом слизистой оболочке (см. табл. 2). При этом наиболее высокие значения активности катепсина D обнаружены в опухолях тела желудка ($179,2 \pm 27,2$ нмоль/мин на 1 мг белка), а наиболее низкие — в опухолях антрального отдела ($141,9 \pm 19,2$ нмоль/мин на 1 мг белка). В то же время самая высокая активность катепсина В отмечена в опухолях антрального отдела желудка ($263,1 \pm 23,5$ пмоль/мин на 1 мг белка) и наиболее низкая — в опухолях проксимального отдела ($103,6 \pm 29,2$ пмоль/мин на 1 мг белка).

Анализ полученных нами данных по изучению активности исследуемых протеолитических ферментов в опухолях желудка с учетом стадии заболевания позволил выявить следующие особенности. Средние показатели активности катепсинов В и L в группе больных с I—II стадией заболевания оказались выше средних показателей активности ферментов в группе больных с III—IV стадией ($240,0 \pm 28,6$ и $186,0 \pm 35,5$ пмоль/мин на 1 мг белка для катепсина В, $67,4 \pm 7,2$ и $58,6 \pm 7,7$ пмоль/мин на 1 мг белка для катепсина L). Активность катепсина D в опухолях больных с I—II и III—IV стадией рака желудка была одинаковой и равнялась $164,3 \pm 16,3$ и $163,4 \pm 21,6$ нмоль/мин на 1 мг белка соответственно.

В настоящем исследовании отмечена более низкая активность катепсинов В и L в опухолях, прораставших серозный слой стенки желудка и за его пределы ($240,6 \pm 34,7$ и $71,6 \pm 6,0$ пмоль/мин на 1 мг белка соответственно). В опухолях, прораставших не глубже мышечного слоя, активность катепсинов В и L была несколько ниже ($176,5 \pm 30,3$ и $53,7 \pm 6,5$ пмоль/мин на 1 мг белка соответственно). Активность катепсина D в опухолях, характеризовавшихся выраженной инвазирующей способностью, не отличалась ($162,9 \pm 19,1$ нмоль/мин на 1 мг

Таблица 1

Table 1

Активность протеолитических ферментов в регионарных лимфатических узлах у больных раком желудка
Activity of proteolytic enzymes in regional lymph nodes in gastric cancer patients

Фермент	Лимфатические узлы	
	пораженные метастазами	не пораженные метастазами
Катепсин D, нмоль/мин на 1 мг белка Cathepsin D, nmol/min per mg protein	$142,6 \pm 21,1^*$	$31,3 \pm 9,1$
Катепсин В, пмоль/мин на 1 мг белка Cathepsin B, pmol/min per mg protein	$82,6 \pm 13,9$	$88,1 \pm 21,2$
Катепсин L, пмоль/мин на 1 мг белка Cathepsin L, pmol/min per mg protein	$39,5 \pm 10,5$	$42,1 \pm 5,4$
Enzyme	metastatic	intact
	Lymph nodes	

*Достоверно относительно не пораженных опухолевым процессом лимфатических узлов, $p < 0,02$.

* Difference in relation to intact lymph nodes is statistically significant, $p < 0.02$.

ach we studied activity of the proteolytic enzymes with regard to tumor site.

We discovered that mean values of cathepsin D activity in intact mucosa of the proximal and antral gastric sections were significantly higher than in the mucosa of the stomach body ($p < 0.05$). Differences in the activity of cathepsins B and L in intact mucosas from different anatomical sites of the stomach were not statistically significant (table 2).

In all anatomical regions of the stomach mean values of enzymatic activity in the tumor were higher as compared to intact mucosas (see table 2). Cathepsin D activity was the highest in tumors from the gastric body (179.2 ± 27.2 nmol/min per mg protein), and the lowest in antral tumors (141.9 ± 19.2 nmol/min per mg protein). Cathepsin B activity was the highest in tumors from the antral section of the stomach (263.1 ± 23.5 pmol/min per mg protein) and the lowest in tumors of the proximal section (103.6 ± 29.2 pmol/min per mg protein).

Analysis of the proteolytic enzyme activity in gastric tumors with regard to disease stage showed the following. Mean values of cathepsin B and L activity in stage I—II disease were higher than similar parameters in stage III—IV disease (240.0 ± 28.6 vs 186.0 ± 35.5 pmol/min per mg protein for cathepsin B, and 67.4 ± 7.2 vs 58.6 ± 7.7 pmol/min per mg protein for cathepsin L). Cathepsin D activity in stage I—II and III—IV gastric cancer was similar 164.3 ± 16.3 vs 163.4 ± 21.6 nmol/min per mg protein, respectively.

Our investigation discovered lower activity of cathepsins B and L in tumors growing through the stomach wall serosa and further (240.6 ± 34.7 vs 71.6 ± 6.0 pmol/min per mg protein, respectively). In tumors invading no deeper than the muscular layer the activity of cathepsins B and L was somewhat lower (176.5 ± 30.3 vs 53.7 ± 6.5 pmol/min

белка) от активности фермента в опухолях, не прораставших в серозную оболочку желудка ($152,5 \pm 12,3$ нмоль/мин на 1 мг белка).

Преобладающее число обследованных нами больных (59,5%) имели низкодифференцированные опухоли, 37% — умеренно дифференцированные. При исследовании активности катепсинов В, L и D в опухолях желудка различной степени дифференцировки были получены следующие данные. Активность катепсинов В и L в умеренно дифференцированных опухолях ($205,0 \pm 55,8$ и $65,4 \pm 5,7$ пмоль/мин на 1 мг белка соответственно) не превышала активности изученных ферментов в низкодифференцированных опухолях ($201,6 \pm 34,2$ и $60,1 \pm 7,5$ пмоль/мин на 1 мг белка соответственно). Средние показатели активности катепсина D оказались более высокими в низкодифференцированных опухолях ($171,9 \pm 22,3$ нмоль/мин на 1 мг белка), чем в умеренно дифференцированных ($147,8 \pm 13,4$ нмоль/мин на 1 мг белка). Однако данные различия статистически не достоверны.

При исследовании активности протеолитических ферментов в опухолях с различной степенью клеточного и структурного атипизма отмечено увеличение активности катепсина D в опухолях с III степенью структурного атипизма (SAT III — $170,7 \pm 21,4$ нмоль/мин на 1 мг белка, SAT I — II — $142,9 \pm 18,7$ нмоль/мин на 1 мг белка). Повышение активности катепсинов В и L обнаружено в опухолях, характеризовавшихся I — II степенью структурного атипизма ($310,2 \pm 43,0$ и $126,5 \pm 15,7$ пмоль/мин на 1 мг белка для катепсина В, $70,6 \pm 8,4$ и $56,5 \pm 7,4$ пмоль/мин на 1 мг белка для катепсина L). Различия в активности катепсинов В и L с учетом степени структурного и клеточного атипизма опухоли оказались статистически достоверными ($p < 0,02$). В опухолях с I — II степенью клеточного атипизма значения активности катепсинов В и L составили $212,3 \pm 44,1$ и $64,3 \pm 15,7$ пмоль/мин на 1 мг белка соответственно. В опухолях с III степенью клеточного атипизма показатели активности катепсинов В и L были ниже ($137,0 \pm 17,1$ и $57,8 \pm 7,0$ пмоль/мин на 1 мг белка соответственно). Не отмечено зависимости между активностью катепсина D и степенью клеточного атипизма опухоли.

Изучение активности цистеиновых протеиназ — катепсинов В, L и аспартильной протеиназы, т. е. катепсина D — у больных раком желудка позволило сделать вывод о повышении активности всех исследованных протеолитических ферментов в злокачественных опухолях желудка по сравнению с уровнем их активности в образцах не пораженной опухолевым процессом слизистой оболочки соответствующего анатомического отдела желудка.

По данным разных авторов [11, 14, 15], метастазы в регионарных лимфатических узлах при раке молочной железы характеризовались высокими уровнями активности катепсина D. В настоящем исследовании также отмечено статистически достоверное увеличение активности катепсина D в пораженных метастазами лимфатических узлах. М. Watanabe и соавт. [16] отметили повышение показателей активности катепсина В в регионарных лимфатических узлах, пораженных метастазами при раке желудка. Обнаруженный авторами факт не получил подтверждения при проведении настоящего исследования — средние показатели активности катепсинов В и L в лимфатических узлах с метастазами и без метастазов не различались.

У преобладающего числа больных раком желудка нами обнаружена положительная зависимость между повышением активности катепсина D и такими неблагоприятными клиничко-морфологическими признаками заболевания, как

Таблица 2

Table 2

Активность протеолитических ферментов в раковой опухоли желудка с учетом ее локализации в анатомическом отделе пораженного органа

Activity of proteolytic enzymes in gastric cancer with respect to tumor anatomical site in the stomach

Анатомический отдел желудка	Фермент		
	катепсин D	катепсин В	катепсин L
Антральный: Antral:			
опухоль / tumor	141,9 $\pm$ 19,2	263,1 $\pm$ 23,5*	60,6 $\pm$ 10,5*
слизистая оболочка mucosa	121,9 $\pm$ 20,4	81,2 $\pm$ 12,9	33,5 $\pm$ 5,6
Тело: Body:			
опухоль / tumor	179,2 $\pm$ 27,2*	189,2 $\pm$ 27,5*	60,5 $\pm$ 10,0*
слизистая оболочка mucosa	85,3 $\pm$ 8,0	73,9 $\pm$ 14,3	26,7 $\pm$ 6,4
Проксимальный: Proximal:			
опухоль / tumor	161,0 $\pm$ 30,2	103,6 $\pm$ 29,2	55,8 $\pm$ 7,1
слизистая оболочка mucosa	133,6 $\pm$ 26,5	46,9 $\pm$ 12,9	35,9 $\pm$ 7,4
Anatomical region of the stomach	cathepsin D	cathepsin B	cathepsin L
	Enzyme		

*Достоверно относительно не пораженной опухолевым процессом слизистой желудка, $p < 0,05$.

* Difference in relation to intact mucosa is statistically significant, $p < 0,05$.

per mg protein, respectively). Cathepsin D activity in tumors with markable invasion potential ($162,9 \pm 19,1$ nmol/min per mg protein) showed no difference with the activity in tumors not invading gastral serosa ($152,5 \pm 12,3$ nmol/min per mg protein).

Most of the patients under study (59.5%) had poorly differentiated tumors, 37% — moderately differentiated tumors. Analysis of activity of cathepsins B, D and L in gastric tumors with respect to degree of tumor differentiation revealed the following. Activity of cathepsins B and L in moderately differentiated tumors ($205,0 \pm 55,8$ and $65,4 \pm 5,7$ pmol/min per mg protein, respectively) did not exceed the enzymes' activity in poorly differentiated tumors ($201,6 \pm 34,2$ and $60,1 \pm 7,5$ pmol/min per mg protein, respectively). Mean values of cathepsin D activity were higher in poorly differentiated tumors ($171,9 \pm 22,3$ nmol/min per mg protein) than in moderately differentiated ones ($147,8 \pm 13,4$ nmol/min per mg protein). However, the differences were not statistically significant.

Analysis of proteolytic enzymes in tumors with different degrees of cellular and structural atypism showed increased activity of cathepsin D in tumors with grade III structural atypism (SAT III — $170,7 \pm 21,4$ nmol/min per mg protein, SAT I — II — $142,9 \pm 18,7$ nmol/min per mg protein). Activity of cathepsins B and L was increased in tumors of grade I — II structural atypism ($310,2 \pm 43,0$ and

увеличение глубины инвазии и инфильтрации стенки желудка, снижение степени дифференцировки опухоли.

Данные, представленные на основании настоящего исследования, подтверждаются существующим в современной литературе мнением о важной роли протеолитических ферментов, секретлируемых клетками злокачественных новообразований, в процессах инвазии и метастазирования. Авторами экспериментальных работ получены косвенные доказательства связи процессов протеолиза с механизмами канцерогенеза, а именно: способность протеолитических ферментов разрушать нормальную архитектуру ткани, облегчая инфильтрацию опухолевых клеток в ткани хозяина, удалять с поверхности клеток определенные белки, что приводит к ликвидации контактного торможения роста и изменению адгезивных свойств клеток, расщеплять высокомолекулярные соединения тканей хозяина и обеспечивать раковые клетки питательными веществами, необходимыми для опухолевого роста, разрушать первичные мембраны капилляров, способствуя проникновению раковых клеток через стенки сосудов к тканям хозяина и образованию метастазов, ослаблять антигенные свойства раковых клеток, расщепляя определенные участки, ответственные за иммуноспецифичность, модифицировать иммуноглобулины таким образом, что они теряют свою защитную функцию против раковых антигенов [1, 2, 4, 12]. Это далеко не полный перечень тех реакций, в механизмах которых активное участие принимают протеолитические ферменты. По мнению ряда авторов [2, 10], оценка активности протеаз в опухолях может служить показателем метастатического потенциала и инвазивной способности опухоли.

Инвазивность опухолей, степень их злокачественности и корреляция активности протеолитических ферментов с клиническим течением заболевания уже показаны в работах ряда исследователей [13, 14]. Следовательно, изучение противоопухолевого действия естественных и синтетических ингибиторов протеолиза, способности последних тормозить рост опухоли, задерживать ее инвазию и метастазирование — одно из важных направлений экспериментальной и клинической онкологии.

Обнаруженная в настоящем исследовании корреляционная зависимость между активностью катепсина D и основными клинико-морфологическими характеристиками рака желудка позволяет высказывать предположение о возможном использовании этого показателя в виде дополнительного прогностического фактора. Однако это предположение может быть подтверждено только после ретроспективного анализа клинического течения заболевания с учетом полученных данных по изучению активности катепсина D в злокачественных новообразованиях желудка.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии. — Киев, 1988.
2. Козырева Е. А., Жордания К. И., Бассалык Л. С., Васильев А. В. *Вопр. мед. химии.* — 1991. — Т. 37, № 4. — С. 20—23.
3. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. — М., 1976.
4. Barret A. J. // *Biochem. J.* — 1973. — Vol. 131. — P. 809—822.
5. Dufek V., Jirasek V., Kral V. // *Neoplasma (Bratisl.)*. — 1985. — Vol. 32, N 1. — P. 51—54.
6. Etherington D. G. // *Protein Degradation in Health and Disease.* — New York, 1980. — P. 87—113.
7. Kishke H., Kembhari A. A., Bohley P. et. al. // *Biochem. J.* — 1982. — Vol. 201. — P. 367—372.

126.5±15.7 pmol/min per mg protein for cathepsin B, 70.6±8.4 and 56.5±7.4 pmol/min per mg protein for cathepsin L). The differences in the activity of cathepsins B and L with respect to tumor structural and cellular atypism were statistically significant ($p<0.02$). In tumors of grade I—II cellular atypism the activities of cathepsins B and L were 212.3±44.1 and 64.3±15.7 pmol/min per mg protein, respectively. In tumors with grade III cellular atypism the activities of cathepsins B and L were lower (137.0±17.1 and 57.8±7.0 pmol/min per mg protein, respectively). There was no correlation of the cathepsin D activity and the tumor cellular atypism.

The study of activity of cysteine proteinases, cathepsins B and L, and an aspartile proteinase, cathepsin D, in gastric cancer demonstrated increased activity of all the proteolytic enzymes in malignant tumors of the stomach as compared to their activities in specimens of mucosa of the corresponding gastral site not affected by the tumor.

By data of various authors [11, 14, 15] regional lymph node metastases of breast cancer exhibited increased cathepsin D activity. Our findings also showed a statistically significant increase in cathepsin D activity in lymph node metastases. M. Watanabe et al. [16] found increased cathepsin B activity in regional lymph node metastases of gastric cancer. This fact was not confirmed by our results which suggested no difference between activities of cathepsins B and L in lymph nodes with and without metastases.

Most of the gastric cancer patients studied demonstrated a positive correlation of elevated cathepsin D activity with increased depth of invasion and gastral wall infiltration, or with decreased tumor differentiation, which were regarded poor clinical and morphological factors.

Our data are in agreement with the present opinion about the significant role of proteolytic enzymes secreted by cells of malignant tumors in the processes of invasion and metastasis. Experimental investigations give evidence in support of relation of proteolytic processes to carcinogenic mechanisms, viz the ability of proteolytic enzymes to destroy normal tissular architectonics thus facilitating tumor cell infiltration in the host's tissue, to remove certain proteins from cellular surface, which leads to suppression of contact inhibition of the tumor growth and changes cellular adhesive properties, to split high molecular compounds of the host's tissues and to provide cancer cells with nutrients required for tumor growth, to destroy primary capillary membranes thus promoting cancer cell invasion of the host's tissue through vascular walls and development of metastases, to weaken antigenic activity of cancer cells by splitting certain regions responsible for immunospecificity, to modify immunoglobulins in such a way that they lose their protective activity against cancer antigens [1, 2, 4, 12]. This is but incomplete list of the reactions closely associated with proteolytic enzymes. Some authors [2, 10] believe that proteinase activity in the tumor may be an indicator of metastatic and invasive potential of the tumor.

The correlation of activity of proteolytic enzymes with clinical course of disease is supported by several investigations [13, 14]. Therefore, study of antitumor activity of natural and synthetic inhibitors of proteolysis, their ability to suppress tumor growth, inhibit its invasion and metastasis is an important field of experimental and clinical oncology.

The correlation of cathepsin D activity with basic clinical and morphological features of gastric cancer discovered in this investigation suggests utilization of this

8. *Jamaguchi N., Chang S. M., Shiroeda O. // Cancer Res. — 1990. — Vol. 50. — P. 658—663.*
9. *Liotta L. A., Rao C. N., Barsky S. H. // Lab. Invest. — 1983. — Vol. 49. — P. 636—648.*
10. *Mullins D. E., Rohlich S. T. // Biochim. Biophys. Acta. — 1982. — Vol. 695. — P. 177—214.*
11. *Rocheffort H., Augereau P., Briozzo P. et al. // Proc. Ann. Meet. Amer. Ass. Cancer Res. — 1991. — Vol. 32. — P. 467—470.*
12. *Raymond N., Kelen J. // Med. Hypotheses. — 1983. — Vol. 10. — P. 291—293.*
13. *Sloane B. F., Rozhin J. // Proc. nat. Acad. Sci. USA — 1986. — Vol. 83. — P. 2483—2487.*
14. *Spiratos S., Maudelonde T., Brouillet S. R. // Lancet. — 1989. — Vol. 8672. — P. 1115—1121.*
15. *Tandon A. K., Clark G. M., Chamness G. C. et al. // New. Engl. J. Med. — 1990. — Vol. 322, N 5. — P. 297—302.*
16. *Watanabe M., Higashi T., Watanabe A. et al. // Biochem. Med. Metab. Biol. — 1989. — Vol. 42, N 1. — P. 21—29.*

Поступила 21.10.93/Submitted 21.10.93

© Коллектив авторов, 1994
УДК 618.146-006.6-091

Е. А. Дядык, И. В. Василенко, Н. Т. Райхлин

ОСОБЕННОСТИ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ

Медицинский институт, Донецк, НИИ клинической онкологии

В образовании ядрышек главную роль играет специализированный участок хромосом, называемый областью ядрышкового организатора (ОЯОР), или ядрышкообразующим районом, хромосом [2, 6]. ОЯОР локализуется в районе вторичных перетяжек хромосом человека группы D и G. С ОЯОР связаны негистоновые кислые белки, обладающие аргирофильными свойствами [12], что было использовано для выявления ОЯОР при помощи нитрата серебра [11]. Согласно экспериментальным данным, в основе реакции лежит избирательное связывание нитрата серебра с негистоновыми белками хромосомы, которые образуют рибонуклеопротеиновые комплексы с вновь синтезированной рРНК [15]. Как по-

characteristic as an additional prognostic factor. However, this suggestion may be regarded reasonable only after retrospective analysis of the disease clinical course with respect to our findings concerning cathepsin D activity in gastric malignant tumors.

E. Ya. Dyadyk, I. V. Vasilenko, N. T. Raikhlin

PECULIARITIES OF NUCLEOLUS ORGANIZER IN CERVICAL CANCER

Medical Institute, Donetsk, Research Institute of Clinical Oncology

A specialized chromosomal segment called a nucleolus organizer region (NOR) or a nucleolus region plays a considerable part in formation of nucleoli [2,6]. The NOR is located at the region of group D and G human chromosomal secondary constrictions. The NOR is associated with non-histonic acid proteins [12]. This feature is used to reveal NORs with silver nitrate [11]. The reaction is shown experimentally to base on silver nitrate selective binding with chromosomal non-histonic proteins that form ribonucleoprotein complexes with newly synthesized rRNA [15]. Most investigators believe that silver nitrate stains the nucleolus organizers functioning actively during the G2 period [17].

The number of staining NORs in the human karyotype is individual and ranges from 5 to 10 [16]. Argentophilicity of acrocentric chromosomes is a hereditary character and depends upon the number of ribosomal genes and their transcriptional activity.

There are different opinions in the literature [1,3,18,20] about the importance of NOR detection in differential diagnosis of preneoplastic and neoplastic processes. Some authors consider the presence of NORs to be evidence of onset of malignization because there is a considerable increase in the number of silver granules in tumor cells as compared to normal ones [9,18]. While other authors doubt the method potential as for differential diagnosis of preneoplastic and neoplastic processes [7,20].

The purpose of this investigation was to study peculiar features of NORs in cervical cancer and the possibility of utilization of the findings for diagnosis of *in situ* and invasive cervical cancer.

The study was performed in 23 cases that were stratified, as follows: group 1 — intact ectocervical epithelium (9), group 2 — *in situ* cancer (4), group 3 — invasive squamous cell not-keratinizing and keratinizing cervical cancer (6 and 3, respectively). The material to be analyzed was prepared, as follows. Bioptic and surgical specimens were fixed in 10% acid formalin, embedded in paraffin, the sections were stained with hematoxylin and eosin by

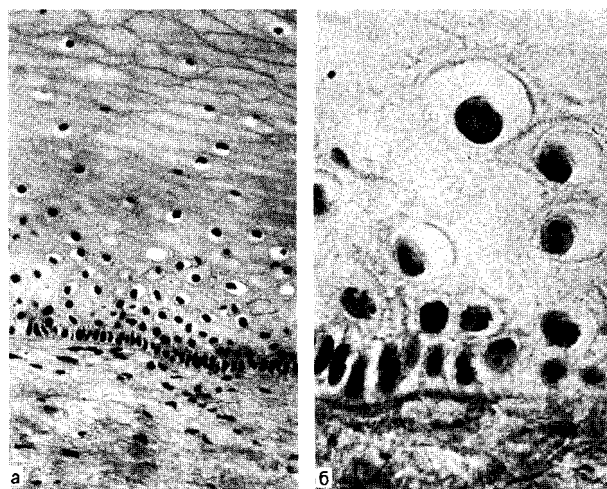


Рис. 1. Нормальный эпителий шейки матки.

а — участок неизмененного эпителия; окраска гематоксилином и эозином. х 250; б — единичные гранулы серебра в ядре; окрашивание нитратом серебра. х 1800.

Fig.1. Normal cervical epithelium.

а, intact epithelial region; hematoxylin and eosin staining. Magn. 250; б, solitary nuclear silver granules; silver nitrate staining. Magn.1800.