# Биология

УДК 616-006:612.015.348

В.В. СЕНЧУК

## БЕЛКИ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

The major components of cytoskeletal and contractile systems (actin and myosin) are involved in a broad range of cellular events – cytokinesis, secretion, motility. Malignization results in dramatic alteration of the cellular molecular biology, including organization of the cytoskeletal and contractile elements.

In this review, we explore the role of actin and myosin in the expression of transformed phenotype, analyze experimental data concerning biochemical properties of actin and myosin, regulatory mechanisms of actin-myosin interaction, expression of actin isoforms and myosin subunits in malignant tumors of different origin. Taken together, the existing data seem to confirm diagnostic value of actin and myosin isoforms analysis and provide new information on the histogenetic origin and the degree of differentiation of malignant tumors.

### Введение

Одним из важнейших направлений в исследовании злокачественных опухолей является поиск биохимических маркеров опухолевых клеток, позволяющих выявить в организме человека очаги патологического процесса и с высокой точностью диагностировать гистогенез и метастатический потенциал раковых клеток, что в значительной степени определяет выбор адекватных методов и режимов терапии. Многочисленными исследованиями установлено [1, 2], что происходящая при канцерогенезе и опухолевом росте глубокая перестройка метаболических процессов в клетках выражается в изменении уровней экспрессии и состава изоформ многих белков. Это явление используется для поиска и выбора маркеров неоплазм. Вместе с тем, несмотря на определенные успехи, достигнутые в этой области, число маркерных белков, используемых для клинической диагностики опухолей, относительно невелико.

В последние годы интересы многих исследователей рака были направлены на поиск высокоинформативных маркеров злокачественного состояния среди цитоскелетных белков, которые представлены рядом изоформ, экспрессирующихся тканеспецифически и в зависимости от степени цитодифференцировки. Относящиеся к этой группе белки промежуточных филаментов получили широкое применение для диагностики ряда злокачественных опухолей человека. Многочисленные публикации по этому вопросу собраны и проанализированы в ряде обзоров и монографий и не будут рассматриваться в настоящей работе. Мы акцентируем внимание на других белковых компонентах цитоскелета, так называемых сократительных белках. Интерес к сократительным системам, представляющим собой динамичный комплекс белков актина и миозина, а также группы ассоциированных с ними белков в связи с проблемой злокачественного роста, обусловлен тем, что сократительные белки выполняют чрезвычайно важные функции в жизнедеятельности клеток и многоклеточных организмов, к числу которых относятся мышечная деятельность, движение, формообразование и деление клеток, секреция, рецепция и другие [3, 4]. Наряду с этим изоформы актина и миозина экспрессируются тканеспецифически и в зависимости от стадии дифференцировки клеток [5]. Последнее обстоятельство дает основание предполагать, что исследование сократительных белков клеток злокачественных опухолей различного гистогенеза и уровня дифференцировки позволит установить ценные в диагностическом отношении закономерности экспрессии изоформ актина и миозина.

Отмеченные вопросы нашли отражение в настоящем обзоре, который является обобщением имеющихся в литературе данных и собственного экспериментального материала, охватывающих состояние проблемы экспрессии, физико-химических и функциональных свойств актина и миозина в клетках злокачественных опухолей и использования белков сократительных систем в качестве диагностических маркеров злокачественных опухолей.

### *Экспрессия, физико-химические и функциональные свойства миозина в клетках злокачественных опухолей*

Прогресс в изучении структуры и биохимических свойств мышечных и немышечных миозинов и их субъединиц послужил основой для исследования характера экспрессии миозина, его участия в формировании сократительных структур раковых клеток и роли миозина в поддержании злокачественного состояния.

В первой работе о свойствах миозина из саркоматозных клеток было показано, что сократительный белок обладает заметной, хотя и менее выраженной, чем у мышечного миозина, Mg-зависимой АТРазной активностью [6]. В последующие годы предметом пристального исследования явились рабдомиосаркомы — злокачественные опухоли скелетно-мышечного происхождения, которые являются наиболее распространенным видом сарком мягких тканей у детей и составляют около 7% всех опухолей детского возраста [7]. Необходимость поиска маркеров рабдомиосарком обусловлена отсутствием надежных методов идентификации различного типа рабдомиосарком, в особенности мало- и недифференцированных, что является существенным препятствием для эффективной терапии [8]. Установлено, что в ряде случаев клетки этих опухолей содержат миозин или некоторые его субъединицы скелетно-мышечного типа [9]. Было обнаружено, что аномальность сократительного аппарата $Ni_3S_2$-индуцированных рабдомиосарком коррелирует с изменением свойств опухолевого миозина, который обладает биохимическим сходством с эмбриональным миозином [10]. Иммуногистохимически миозин выявлен в 80% рабдомиосарком, индуцированных сульфидом никеля, что позволяет отнести его к числу хороших маркеров рабдомиосарком [11]. В клетках низкодифференцированной опухоли мышей рабдомиосаркома А7, индуцированной метилхолантреном, экспрессируется смесь изоформ субъединиц дефинитивного и эмбрионального мышечных миозинов [12].

Проведенные нами исследования на клетках рабдомиосаркомы крыс РА-2 с различной способностью метастазировать в легкие показали, что миозины из исходной опухоли и метастатических образований отличаются по каталитическим свойствам, содержанию в раковых клетках и составу субъединиц [13]. Методом иммуноблоттинга показано, что миозин из рабдомиосаркомы РА-2 содержит тяжелые цепи миозина эмбрионального и дефинитивного скелетно-мышечных типов, причем в метастазах обнаружено увеличение содержания эмбриональной изоформы тяжелых цепей миозина по сравнению с клетками опухоли. Эти данные свидетельствуют не только о нарушении дифференцировочных механизмов в клетках злокачественной опухоли рабдомиосаркома РА-2 и появлении субъединиц миозина, характерных для эмбриональной стадии развития, но и указывают на существование зависимости экспрессии индивидуальных изоформ субъединиц миозина от метастатического потенциала клеток рабдомиосаркомы.

С помощью моноклональных антител против миозина из эмбриональных скелетных мышц показана экспрессия миозина эмбрионального типа в рабдомиосаркомах взрослых и детей [14], в клетках альвеолярной рабдомиосаркомы человека [15] и рабдомиосаркомы крыс, индуцированной вирусом саркомы Молони [16]. Детальное исследование состава тяжелых цепей миозина в рабдомиосаркомах крыс, индуцированных соединениями никеля, позволило обнаружить, что в этих опухолях выявляется несколько вариантов сочетаний различных типов изоформ тяжелых цепей миозина, за исключением тяжелых цепей миозина неонатальных мышц [17]. В результате клинического исследования 21 рабдомиосаркомы человека в 81% случаев получена положительная реакция на присутствие эмбрионального миозина в клетках опухолей, а в 38% – на при-

сутствие тяжелых цепей миозина, характерных для скелетных мышц медленного типа [18].

В опубликованных работах прослеживается взаимосвязь между дифференцировочным статусом клеток рабдомиосарком, степенью сохранения структуры сократительного аппарата клеток, характерного для миофибрилл, и типом экспрессируемых субъединиц миозина. Попытки выявить соответствие между структурно-функциональным состоянием сократительных элементов клеток рабдомиосарком и типом экспрессируемых субъединиц миозина свидетельствуют о том, что в клетках злокачественных опухолей человека и животных скелетно-мышечного происхождения наблюдается блок дифференцировочной программы, что выражается в фенотипической дедифференцировке злокачественных клеток, дезорганизации или полной утрате типичного мышечного сократительного аппарата и экспрессии субъединиц миозина, характерных для ранних стадий развития организма [12, 14, 15, 17]. Таким образом, совокупность этих данных создает предпосылки для использования изоформ тяжелых цепей миозина эмбрионального типа в качестве специфического диагностического маркера для клинической идентификации рабдомиосарком человека.

В связи с проблемой поиска маркеров злокачественных опухолей особый интерес представляет исследование свойств миозина из низкодифференцированных злокачественных опухолей, поскольку точная идентификация подобных неоплазм крайне затруднена. Наши исследования миозина из низкодифференцированной злокачественной опухоли крыс саркома-45 показали, что содержание миозина в клетках опухоли составляет около 2,4% от общего количества белка и эта величина соответствует содержанию миозина в немышечных клетках [19]. Каталитические свойства миозина из саркомы-45 в основном типичны для дефинитивного скелетно-мышечного миозина [19, 20]. В его составе обнаружены тяжелые цепи с молекулярной массой 200 кДа и три типа легких цепей с молекулярными массами 25, 18 и 16,5 кДа [19]. Результаты исследования первичной структуры методом пептидного картирования и анализа антигенной специфичности тяжелых цепей миозина из саркомы-45, особенностей ферментативных свойств миозина, количественного и качественного состава легких цепей миозина по сравнению с эмбриональным и дефинитивным скелетно-мышечным миозинами показывают, что миозин из саркомы-45 содержит смесь изоформ субъединиц, характерных для дефинитивного и эмбрионального скелетно-мышечных миозинов [21]. Таким образом, дискоординация экспрессии изоформ субъединиц миозина в недифференцированных клетках злокачественной опухоли крыс саркома-45 и появление изоформы миозина эмбрионального типа свидетельствуют о глубоком изменении молекулярных механизмов, контролирующих в нормальных клетках экспрессию генов субъединиц миозина.

Важнейшее значение имеет изучение состава субъединиц и биохимических свойств миозинов из клеток злокачественных опухолей немышечного происхождения. С этой точки зрения были проанализированы культивируемые клетки ХеЛа, гепатомы крыс, хориокарциномы человека, меланомы мышей, лейкемические клетки человека [22], злокачественные клетки глиомы крыс и нейробластомы мышей [23]. Миозины из этих клеток содержат субъединицы, сходные по молекулярной массе с легкими цепями миозина из гладких мышц, и обладают свойствами, которые в основном типичны для миозина: Mg ингибирует, а Ca активирует АТРазную активность; АТР и Mg регулируют связывание миозина с фибриллярным актином. Изучение распределения миозина иммунохимическим методом в микрокарциномах и карциномах щитовидной железы выявило наличие миозина во всех клетках опухолей и отсутствие принципиальных различий в характере его распределения [24]. Дальнейшие исследования, направленные на выяснение характера взаимодействия миозинов из злокачественных клеток с актинами, показали, что фосфорилирование легких цепей миозина из клеток асцитного рака Эрлиха киназой легких цепей миозина значительно увеличивает степень активации актином Mg-АТРазы миозина по сравнению с миозином с полностью дефосфорилированными легкими цепями [25]. Другие авторы, исследуя роль фосфорилирования легких цепей миозина во взаимодействии миозина из лейкемических миелобластов [26] и миозина из клеток панкреатической карциномы [27] с фибриллярным актином, обнаружили ферментативную систему регуляции связывания актина и миозина путем фосфорилирования субъединиц миозина, как это имеет место в нормальных гладко-мышечных и

немышечных клетках. Взаимодействие актина и миозина из клеток саркома-45 с образованием функционально активного сократительного комплекса регулируется Са-кальмодулин-зависимым фосфорилированием легких цепей миозина киназой легких цепей миозина [28].

Согласно нашим данным, такой же механизм регуляции взаимодействия актина и миозина функционирует в злокачественных клетках немышечного происхождения карциносаркомы Уокера 256 и саркомы М-1 [29]. При этом было установлено, что состав тяжелых и легких цепей миозинов из клеток немышечных опухолей (карциносаркома Уокера 256, саркома М-1) и каталитические свойства миозинов соответствуют немышечному миозину нормальных клеток. Результаты работы дали основание высказать предположение о том, что в клетках злокачественных опухолей немышечного происхождения возможно сохранение стабильного функционирования молекулярных механизмов, контролирующих экспрессию изоформ субъединиц миозина.

Таким образом, имеющиеся к настоящему времени данные позволяют заключить, что исследованные злокачественные клетки немышечного происхождения содержат субъединицы миозина немышечного типа и обладают системой регуляции активности миозина и его взаимодействия с актином посредством ферментативного фосфорилирования субъединиц, как это имеет место в нормальных гладкомышечных и немышечных клетках [30]. В то же время экспрессия изоформ миозина в клетках опухолей различной степени злокачественности и метастатического потенциала исследована явно недостаточно. Несомненный теоретический и практический интерес этого направления исследований определяется тем обстоятельством, что изменение степени злокачественности и метастазирования связано с радикальными структурными перестройками компонентов цитоскелета, которые в значительной степени определяются структурно-функциональным состоянием белков сократительных систем клетки [2, 3, 4].

### *Экспрессия, физико-химические и функциональные свойства актина в клетках злокачественных опухолей*

Утверждение представлений о том, что для злокачественных клеток характерно существенное нарушение структуры актиновых микрофиламентов, являющееся важным фактором экспрессии трансформированного фенотипа [31], привело к пониманию необходимости исследования молекулярных основ этого явления, т.е. к изучению структурно-функциональных свойств актина, присутствующего в злокачественных клетках.

Первые работы, проведенные в этом направлении, показали, что в немышечных злокачественных клетках наряду с обычными немышечными формами актина выявляется аномальная изоформа. Хамада и соавторы впервые сообщили об обнаружении мутантного β-актина в культивируемых клетках человека, трансформированных химическим канцерогеном [32].

Аналогичные результаты были получены при исследовании актина в фибробластах человека, трансформированных 4-нитрохинолин-1-оксидом [33]. Итогом этой работы явилось установление полной аминокислотной последовательности мутантного актина, которая оказалась идентична первичной структуре немышечного β-актина, за единственным исключением — в положении 244 глицин в нормальном актине заменен на аспарагиновую кислоту в мутантном актине. Селекция клеток с увеличенной туморогенностью и независимостью роста от субстрата вела к появлению еще одной мутантной изоформы β-актина. Интересно, что параллельно возрастанию туморогенности клеток наблюдалось увеличение количественного отношения — мутантные β-актины / нормальный β-актин в растворимой фракции фибробластов и уменьшение этого отношения в цитоскелетной фракции и в ядерном матриксе. По-видимому, в основе редуцированного свойства мутантного актина встраиваться в цитоскелет лежит дефект в способности к полимеризации in vitro и in vivo [34], что в конечном итоге проявляется в радикальном изменении структуры цитоскелета злокачественных клеток по сравнению с нормальными клетками.

Дальнейшее развитие исследований актина в злокачественных клетках привело к формированию представлений о том, что мутантный β-актин является

неотъемлемым фактором экспрессии трансформированного фенотипа [35]. Трансфекция гена мутантного актина в нормальные фибробласты человека приводила к появлению признаков трансформации — анеуплоидии, разрушения системы актиновых микрофиламентов, иммортализации и др. При этом оказалось, что подштаммы клеток с повышенной злокачественностью характеризуются более высоким уровнем экспрессии гена мутантного актина по сравнению с подштаммами с пониженной экспрессией мутантного актина. Несомненно, эти данные являются существенным вкладом в развитие представлений о роли мутантной изоформы актина и возникающих цитоархитектурных дефектах в стимуляции опухолеобразования.

Есть сведения об обнаружении мутантных изоформ актина и в ряде других злокачественных клеток. Так, показано, что мутантный актин присутствует в лейкемических Т-лимфоцитах человека [36], в клетках мышиной саркомы-180 [37] и лейкемии Л5178И мышей, где он преимущественно ассоциирован с ядерным матриксом [38]. Экспрессия мутантного актина в клетках мышиной меланомы В-16 коррелирует с увеличением степени злокачественности клеток В-16 и с формированием стресс-фибрилл в клетках меланомы [39]. Было установлено, что мутантный актин клеток В-16 весьма близок по первичной структуре β-актину, за исключением положения 28, где аргинин β-актина заменен на лейцин в мутантном актине [40].

В результате проведенного нами исследования физико-химических и функциональных свойств актина из клеток низкодифференцированной злокачественной опухоли крыс саркома-45, установлено, что в этих клетках присутствуют β- и γ-изоформы немышечного актина, а также аномальная кислая изоформа актина [41]. Мутантная изоформа актина и немышечные изоформы актина присутствуют в растворимой и цитоскелетной фракциях, причем около 50% актина находится в глобулярной форме, а остальной актин представлен полимеризованной фибриллярной формой [41, 42]. Актин является одним из доминирующих белковых компонентов клеток саркомы-45: его содержание достигает 12% от общего белка [43]. Актин из саркомы-45 проявляет ряд характерных свойств: специфически и с высоким сродством связывается с панкреатической ДНКазой 1 и ингибирует ее активность; обратимо полимеризуется с образованием фибриллярного актина; в полимеризованном состоянии связывается с миозином и специфически активирует его ферментативную активность [43]. Наряду с актином в состав цитоскелетной фракции саркомы-45 входят миозин, тубулин, группа актин-связывающих белков, среди которых выделяется модифицированная форма сывороточного альбумина [44]. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что актин из саркомы-45 по ряду свойств идентичен актину нормальных немышечных клеток. Вместе с тем выявлены и существенные отличия функциональных свойств актина из саркомы-45 от актина нормальных клеток. Главным образом это касается характера взаимодействия актина и миозина [42, 43]. Опухолевый актин участвует в формировании сократительных комплексов с миозинами из скелетных мышц и саркомы-45, функциональная активность которых значительно ниже, чем у актомиозиновых комплексов нормальных клеток. Эти различия обусловлены тем, что в клетках саркомы-45 образуются необычные по составу изоформ актина и субъединиц миозина актомиозиновые сократительные комплексы, содержащие смесь изоформ субъединиц миозина дефинитивного скелетно-мышечного и эмбрионального типов, немышечные изоформы актина и мутантный актин [45]. Исследования актина в других злокачественных опухолях показали, что актины из клеток карциносаркомы Уокера 256 и саркомы М-1, по данным изоэлектрофокусирования и иммуноблоттинга, содержат β- и γ-изоформы немышечного актина, способны полимеризоваться и активировать миозин [13]. При этом мутантные изоформы актина в клетках карциносаркомы Уокера 256 и саркомы М-1 не были обнаружены.

Учитывая то, что за последние годы после аварии на Чернобыльской АЭС в Республике Беларусь зарегистрирован значительный рост заболеваемости раком щитовидной железы, нами проведено исследование состояния актиновых микрофиламентов, содержания изоформ актина в послеоперационных гистологически классифицированных образцах аденом (12 случаев), папиллярных карцином (21 случай) и в нормальных тканях (26 случаев) щитовидной железы пациентов, проходивших лечение в Республиканском центре опухолей щитовид-

ной железы [46]. Результаты анализа актина показывают, что в папиллярной карциноме щитовидной железы общее содержание актина и отношение [β-актин]/[γ-актин] существенно повышены. Эти данные свидетельствуют о значительном изменении экспрессии генов актина в клетках папиллярного рака щитовидной железы. Равновесие между полимерной и мономерной формами актина в злокачественных опухолях сдвигается в сторону накопления фибриллярного актина, в то время как в нормальной ткани преобладает глобулярный актин, что позволяет сделать вывод о дезорганизации сети актиновых микрофиламентов в злокачественных клетках щитовидной железы. Наши исследования показывают, что состояние актина в клетках аденомы и состояние актина в нормальной щитовидной железе оказались очень близкими. В результате установлена корреляция между гистопатологическими и биохимическими аномалиями папиллярного рака щитовидной железы и показана диагностическая ценность анализа изоформ актина для получения полезной информации о гистопатологических особенностях папиллярного рака.

К настоящему времени установлено, что актин может изменяться в злокачественных клетках не только качественно, но и количественно. В фибробластах из остеосаркомы человека экспрессируются β- и γ-изоактины в соотношении 2:1, в то время как в этих же клетках, трансформированных N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином синтезируется на 50% меньше β-изоформы (β:γ = 1:1), что связано с инактивацией одного из двух функционально активных генов β-актина в результате мутации в структурном или регуляторном генах [47]. В культивируемых фибробластах куриного эмбриона после трансформации вирусом саркомы Рауса снижается содержание α-актина, а содержание β- и γ-актинов не изменяется [48]. Сходные результаты [49] свидетельствуют о том, что в фибробластах мышей и крыс выявляются α-, β- и γ-изоформы актина, а в соответствующих злокачественных клетках экспрессируются только β- и γ-изоактины. Исследование структурного состояния цитоскелетного актина злокачественных опухолей крыс карциносаркома Уокера 256 и саркома-45 в процессе опухолевой прогрессии показывает, что при опухолевом росте происходит значительная реорганизация цитоскелета злокачественных клеток, изменяется внутриклеточное распределение компонентов цитоскелета, возрастает ассоциация актина с плазматическими мембранами неопластических клеток, увеличивается содержание полимерных форм актина в составе цитоскелета [50].

В злокачественных опухолях человека гладкомышечного происхождения – лейомиосаркомах – экспрессия α-изоформы гладкомышечного актина коррелирует со степенью цитодифференцировки [51] и является высокоинформативным маркером для диагностирования опухолей, образующихся из гладкомышечных клеток и клеток соединительной ткани, так как в последних эта изоформа актина не синтезируется [52]. Наряду с этим для некоторых типов лейомиосарком характерна утрата одного из маркеров нормальной дифференцировки гладких мышц — гладкомышечной γ-изоформы актина [53], что свидетельствует о блокировании нормальной дифференцировочной программы в этих клетках. Показана экспрессия гладкомышечного α-актина в участках десмопластической реакции в строме 11 раков молочной железы человека, в то время как в клетках стромы 7 желез без патологических процессов α-актин не выявлен [54].

В яичниках человека с эпителиальными злокачественными опухолями гладкомышечный α-актин экспрессируется в строме, а в яичниках со стромальной гиперплазией α-актин практически не обнаруживается [55]. Клетки альвеолярных сарком мягких тканей экспрессируют α-актин скелетных мышц и не содержат α-актин гладких мышц, эмбриональный миозин и медленный скелетномышечный миозин, что свидетельствует о рабдомиобластной дифференцировке [56]. Установлено, что в рабдомиосаркомах экспрессируется, помимо немышечных β- и γ-изоформ актина, значительное количество α-актина скелетномышечного типа, относительное содержание которого составляет в опухолях человека 20–30% от общего количества актина, а в опухолях крыс – 70–85%, что является отражением более высокой степени дифференцировки опухолей крыс [57]. Изучение экспрессии изоформ актина в клетках 14 рабдомиосарком детей показало, что α-изоформа скелетно-мышечного актина может быть полезна для диагностики рабдомиосарком глазницы [58], а также менингиальных

рабдомиосарком [59]. Вместе с тем в клетках рабдомиосарком гладкомышечные изоформы актина не экспрессируются [57, 58].

Таким образом, многочисленные данные, полученные за последние годы, убедительно свидетельствуют о возможности использования методов анализа экспрессии изоформ актина в качестве ценного диагностического маркера для клинической идентификации злокачественных опухолей различного гистогенеза.

## Заключение

Анализ структурно-функциональных свойств основых компонентов сократительных систем злокачественных клеток (актина и миозина) убедительно свидетельствует о том, что характер экспрессии определенных изоформ сократительных белков является важным фактором поддержания злокачественного состояния.

Одним из наиболее общих проявлений злокачественного состояния является нарушение нормального протекания процесса дифференцировки клеток, зачастую выражающееся в их дедифференцировке, т.е. в приобретении некоторых элементов фенотипа, характерного для ранних этапов развития организма. В миогенных злокачественных опухолях дедифференцировка выражается в упрощении организации или в разрушении сократительного аппарата. В основе этого явления лежит изменение экспрессии изоформ сократительных белков: в рабдомиосаркомах появляются тяжелые цепи миозина эмбрионального типа, снижается содержание изоформы миозина дефинитивного скелетно-мышечного типа и $\alpha$-изоформы скелетно-мышечного актина, а также увеличивается содержание немышечных изоформ актина; в лейомиосаркомах снижается относительное содержание $\gamma$-изоформы гладкомышечного актина.

Исследования, выполненные на клиническом материале, показывают значительную диагностическую ценность выявления тяжелых цепей миозина эмбрионального типа, $\alpha$-актина скелетных мышц, гладкомышечных $\alpha$- и $\gamma$-изоформ актина для идентификации рабдо- и лейомиосарком. Это весьма важно для клинического анализа недифференцированных сарком, особенно в тех случаях, когда отсутствуют надежные диагностические маркеры опухолевых клеток. Установлено, что в клетках низкодифференцированных злокачественных опухолей происходят глубокие изменения характера экспрессии изоформ актина и субъединиц миозина, приводящие к формированию необычного по белковому составу и свойствам актомиозинового сократительного комплекса. Стабильность экспрессии изоформ сократительных белков, сопровождающая реализацию дифференцировочных программ нормальных клеток, нарушается при злокачественном перерождении. По-видимому, дискоординация молекулярных механизмов, контролирующих экспрессию изоформ актина и субъединиц миозина, является следствием чрезвычайно высокой генетической нестабильности клеток злокачественных опухолей [60]. В этом отношении особый интерес представляет обнаружение в ряде злокачественных клеток мутантных изоформ актина, уровень экспрессии которых коррелирует со степенью злокачественности, способности к метастазированию. Эти данные создают предпосылки для использования мутантного актина в качестве диагностического маркера.

В связи с этим представляется актуальным развитие исследований в направлении поиска в культивируемых клетках злокачественных опухолей человека, в биопсийном и клиническом материале не только мутантных форм актина, но и мутантных изоформ субъединиц миозина. Результаты исследования опухолей немышечного происхождения показывают, что в некоторых подобных злокачественных опухолях экспрессируются только немышечные изоформы сократительных белков, а количественные изменения их экспрессии могут иметь определенное диагностическое значение в клинической и экспериментальной онкологии.

Таким образом, подводя итог анализа структурно-функционального состояния белков сократительных систем злокачественных опухолей, можно заключить, что результаты исследований создают реальную основу практического использования белков сократительных систем в качестве высокоинформативных маркеров злокачественных опухолей человека, не только дополняющих дан-

ные иммунофлуоресцентного и ультраструктурного электронно-микроскопического анализов, но и имеющих самостоятельную диагностическую ценность.


1. Ходосова И.А. Ферменты опухолевых клеток. Л., 1988.
2. Rao K.M., Cohen H.J. // Mutat-Res. 1991.V. 256. № 2-6. P. 139.
3. Mori N., Asai J. // Rinsho-Byori. 1993. Suppl 94. P.175.
4. Jagla K., Safiejko-Mroczka B, Domaniewski J. // Postepy-Biochem. 1991. V. 37. № 1. P. 34.
5. Emerson C.P., Bernstein S.I. // Ann. Rev. Biochem. 1987. V. 115. P. 43.
6. Иванов И.И., Юрьев В.А. Биохимия и патобиохимия мышц. Л., 1961. С.143.
7. Противоопухолевая химиотерапия: (Справ.). М., 1986. С.136.
8. Erlandson R.A. // Ultrastruct. Pathol. 1987. V.11. N2-3. P.83.
9. Whalen R.G. // J. Exp. Biol. 1985. V. 115. P. 43.
10. Hildebrand H.F., Kerchaert J.P., Biserte G. et al. // Europ.J. Cell. Biol. 1980. V. 20. P.240.
11. Roy R., Sretar F., Sarbar S. // Develop. Biol. 1979. V.69. № 1. P. 15.
12. Матвеев Вл. Вл. // Цитология. 1986. Т. 28. № 2. С. 186.
13. Lastovskaya L.A., Dashkevich I.N., Senchuk V.V. // Int. Symp. "Biological Motility". Puschino. Russia. 1994. P. 126.
14. Narusava M., Fitzsimons R.B., Izumo S. et al. // J.Cell.Biol. 1987.V.104.№ 3. P. 447.
15. Nanni R., Schiaffino S., De Nicoletti G. et al. // Brit. J. Cancer. 1986. V. 54. № 6. P. 1009.
16. Azarello G., Sartore S., Saggin L. et al. // J.Cancer Res. Clin. Oncol. 1987. V. 113. № 5. P. 417.
17. Schiaffino S., Gorza L., Sartore S. et al. // Exp. Cell.Res.1986. V. 163. № 1. P. 211.
18. Caplan A.I., Fiszman M.Y., Eppenberger H.M. // Science. 1983. V. 221. P. 921.
19. Pikulev A.T., Senchuk V.V., Sholukh M.V., Taborsky O. / In Abstracts of 14th IUB Congress. Prague. 1988, V. 1. P. 134.
20. Сенчук В.В., Пикулев А.Т., Шолух М.В. // Биохимия. 1989. Т.54. № 12. С.1939.
21. Senchuk V.V., Pikulev A.T., Dashkevich I.N. / In Abstracts of 20th FEBS Meeting. Budapest. Hungary. 1990. P. 134.
22. Ostlund R.E., Pastan I. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 453. № 1. P. 37.
23. Miller C., Kuehl W.M. // Brain Res. 1976. V.108. N1.P.115.
24. Demeure M.J., Hughes-Fulford M., Goretzki P.E. et al. // Surgery. 1990. V.108. № 6. P.986.
25. Kuznicki J., Filipek A. // Int. J. Biochem. 1988. V. 20. N. 11. P. 1203.
26. Sagara J., Nagata K., Ichikawa Y. // Biochem. J.1983. V.214. № 4. P.839.
27. Watanabe T.K., Kuczmarsky E.R., Reddy J.K. // Biochem. J. 1987. V.247. N.3. P. 513.
28. Сенчук В.В., Пикулев А.Т., Шолух М.В. / Тез. докл. VI Всесоюз. симпозиума. Петрозаводск, 1988. С. 89.
29. Silvanovich S.F., Senchuk V.V. / Int. Symp. "Biological Motility". Puschino. Russia. 1994. P. 137.
30. Kuznicki J., Barylko B. // Int. J. Biochem. 1988.V.20. N. 6. P. 559.
31. Holme T.C. // Eur.J.Surg.Oncol. 1990. V16. № 2.P. 161.
32. Hamada H., Kakunaga T., Leavitt J. // Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1981. V.78. P.3634.
33. Leavitt J., Ng S.-Y., Verma M. et al. // Mol.Cell Biol. 1987. V.7. № 7. P.2467.
34. Kakunaga T., Leavitt J., Hamada H. // Fed. Proc. 1984. V.43. P.2275.
35. Kakunaga T., Leavitt J., Hirakawa T., Taniguchi S. // Transformed Phenotype. 1984. P.67.
36. Leavitt J., Leavitt A., Attalah A.M. // J.Biol.Chem. 1980. V.255. N11. P.4984.
37. Bravo R., Fey S.V., Larsen P.M., Celis J.E. // Cell. 1981. V. 25. N1. P.195.
38. Nakayasu H., Ueda K. // Exp. Cell. Res. 1986. V.163. N2. P.327.
39. Sadano H., Taniguchi S., Kakunaga T., Baba T. // J.Biol. Chem.1988. V.263. № 31. P.15868.
40. Taniguchi S., Sadano H., Kakunaga T., Baba T. // Jap.J.Cancer Res. 1989. V.80. N1. P.31.
41. Сенчук В.В., Пикулев А.Т., Дашкевич И.Н. // Метаболические нарушения и их коррекция в онкологии: Сб. докл. Всесоюз. конф. М., 1991. С. 22.
42. Сенчук В.В., Пикулев А.Т., Дашкевич И.Н. // Биохимия. 1991. Т. 56. № 12. С. 2235.
43. Сенчук В.В., Дашкевич И.Н. // Биофизика и биохимия биологической подвижности: Тез. докл. 9-го Всесоюз. симпозиума. Тбилиси, 1990. С.127.
44. Сенчук В.В., Дашкевич И.Н. // Там же. С. 114.
45. Senchuk V.V., Pikulev A.T. // Int. Symp. "Biological Motility". Puschino. Russia, 1994. P. 53.
46. Senchuk V., Stozharov A., Demidchyk E. // 9th International Conference on Diagnostic Quantitative Pathology. Heidelberg. German Cancer Research Center, 1995.
47. Goldstein D., Leavitt J. // Cancer Res. 1985. V.45. N7. P.3256.
48. Witt D.P., Brown D.J., Gordon J.A. // J.Cell.Biol. 1983. V.96. N6. P.1766.
49. Leavitt J., Gunning P., Kedes L., Sariwara R. // Nature. 1985. V.316. N4. P.840.
50. Сенчук В.В., Ластовская Л.А. // Вестн. Белорус.ун-та.Сер.2. 1994. № 2. С.25.

51. Eyden B.P., Hale R.J., Richmond I., Buckley C.H. // Virchows. Arch. Pathol. Anat. Histopathol. 1992. V. 420. P. 51.
52. Schurch W., Skalli O., Lagace R. et al. // Am.J.Pathol. 1990. V. 136. № 4. P. 771.
53. Skalli O., Gabbiani G. // Differentiation. 1987. V.33. N3. P. 232.
54. Schurch W., Skalli O., Seemayer T.A., Gabbiani G. // Am.J. Pathol. 1990. V. 136. N4. P. 771.
55. Czernobilsky B., Shezen E., Fogel M. et al. // Virchows Arch. B.1989. V.57. N1.P.55.
56. Jones H., Steart P., Du-Boulay C., Roche W. // J.Pathol. 1990. V. 162. № 1. P. 29.
57. Vandekerckhove J., Osborn M., Altmannsberger M., Weber K. // Differentiation. 1987. V.35. N2. P.126.
58. Cintorino M., Vindigni C., Del Vecchio M. et al. // J.Subm. Cytol.Pathol. 1989. V.21. N3. P.409.
59. Ferracini R., Poggi S., Frank G. et al. // Neurosurgery. 1992. V. 30. № 5. P. 782.
60. Лобко Г.Н., Порубова Г.М. Резистентность опухолей. Мн., 1989.

*УДК 612.278*

*А.П. МАЛЫХИНА, Н.Н. ПЕТРАШЕВСКАЯ, Л.М. ЛОБАНОК*

# МОДИФИКАЦИЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МИОЦИТОВ ПРАВОГО ПРЕДСЕРДИЯ ПРИ ГИПОКСИИ И РЕОКСИГЕНАЦИИ

Were studed the electrophysiology characteristics of right auricle rat.myocytes during hypoxia and reoxigenation. Had been shown, that hypoxia considerably reduces the action potential duration and causes the modification of the relation between frequency of cardiac stimulation and the action potential duration. Reoxygenation restores the ability of myocard cells to react on the shoterning of interstimulation interval.

Исследование электрофизиологических эффектов гипоксии необходимо для познания механизмов и природы аритмий, возникающих при ишемии сердца. Одним из основных методических подходов изучения клеточных механизмов ишемического повреждения миокарда является его моделирование путем перфузии изолированного сердца гипоксическими растворами [1]. К настоящему времени основные электрофизиологические проявления гипоксических повреждений клеток миокарда установлены на желудочковых кардиомиоцитах и клетках проводящей системы [2]. С учетом особенности ионных механизмов возникновения потенциалов действия в различных клетках сердца представляется необходимым изучить влияние гипоксии на электрогенез кардиомицитов предсердий.

## Материал и методика

Опыты проведены на крысах-самках линии Вистар массой 180–200 г. Животных наркотизировали тиопенталом натрия (50 мг/кг массы тела) внутрибрюшинно. Выделяли сердце и отделяли правое предсердие, отсекая зону синусового узла. Выделенные фрагменты правого предсердия помещали в камеру с раствором Кребса — Хензелейта следующего состава: 120 мМ NaCl, 4,8 мМ KCl, 20 мМ $NaHCO_3$, 1,2 мМ $KH_2PO_4$, 1,25 мМ $MgSO_4$, 1,25 мМ $CaCl_2$ и 8,6 мМ $C_6H_{12}O_6$, который насыщали карбогеном при температуре 37 °С.

Регистрацию внутриклеточной активности осуществляли "плавающими" микроэлектродами с сопротивлением 20–40 МОм, которые заполняли 3-х молярным раствором KCl. Микроэлектроды изготавливались из заготовок со стекловолокном внутри на микрокузницеМЭ-4. Биоэлектрическую активность кардиомиоцитов регистрировали с помощью микроэлектродного усилителя "EXPERIMETRIA" (Венгрия) и осциллоскопа VM-42. Измеряли потенциал покоя (ПП, мВ), амплитуду потенциала действия (АПД) и длительность ПД (ДПД) на уровне 10, 25, 50, 75 и 90% реполяризации.

Стимуляцию препаратов проводили программируемым электростимулятором "EXPERIMETRIA" (Венгрия), частоту стимуляции повышали от 1 до 3 Гц, длительность стимуляции на каждой частоте составляла 100 мс. Измерение электрофизиологических параметров проводили на каждой частоте стимуляции для выявления зависимости частота–длительность, причем для выяснения данной зависимости в каждом из препаратов исследовалось 5 различных клеток. Параметры биоэлектрической активности при ступенчатом повышении частоты стимуляции (1, 2 и 3 Гц) регистрировали в контроле, при перфузии гипок-