

УДК 577.151.63; 616.006.6

РОЛЬ ПРОТЕОЛІЗУ В ГОРМОНОПОЕЗІ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ЗА КАНЦЕРОГЕНЕЗУ

В. Чорна*, О. Лянна*, М. Хворостенко, О. Бразалук****

**Дніпропетровський національний університет
вул. Наукова, 13, Дніпропетровськ 49050, Україна*

***Дніпропетровська державна медична академія
вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ 49050, Україна*

Відомо, що лізосомні цистеїнові протеїнази (катепсини) беруть участь у канцерогенезі різної нозології. Недостатньо з'ясованою є їх участь у розвитку онкологічних захворювань щитоподібної залози (ЩЗ). Метою роботи було визначити рівень активності лізосомного цистеїнового катепсину L у плазмі крові хворих із доброякісними та злоякісними пухлинами щитоподібної залози та з'ясувати роль даного ферменту в механізмах утворення гормонів щитоподібної залози. Встановлено, що зростання рівня активності катепсину L у плазмі крові хворих зі злоякісними пухлинами ЩЗ може свідчити про порушення протеолізу при злоякісній трансформації тироцитів, що призводить до змін у механізмах гормонуутворення за канцерогенезу ЩЗ.

Ключові слова: лізосомні цистеїнові катепсини, канцерогенез, щитоподібна залоза, плазма крові, тиреоїдні гормони.

Унаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, яка класифікується як глобальна техногенна катастрофа, загострення екологічної ситуації, рівень захворюваності населення країни невпинно зростає [3, 4]. На окрему увагу в цьому питанні заслуговує проблема канцерогенезу щитоподібної залози (ЩЗ) [2, 5, 6]. Незважаючи на помітний прогрес у розумінні механізмів розвитку та перебігу онкологічних захворювань щитоподібної залози [12, 15], кількість хворих із даною патологією невпинно зростає [3], що спонукає до пошуку нових маркерів ранньої діагностики, показників перебігу хвороби та критеріїв прогнозу даної онкопатології. Основні труднощі у своєчасній діагностиці онкологічних захворювань ЩЗ зумовлені тим, що рак може тривалий час існувати під виглядом або на фоні інших патологій даного органа [3]. Відомо, що функція щитоподібної залози залежить від циклу синтезу прогормону тиреоглобуліну та його протеолітичної деградації, спрямованої на підтримку сталого рівня тиреоїдних гормонів у крові людини [11]. З даних літератури відомо, що лізосомні цистеїнові протеїнази беруть безпосередню участь у процесингу тиреоглобуліну [11]. За сучасними уявленнями, лізосомні цистеїнові протеїнази (катепсини) відіграють важливу роль у багатьох як фізіологічних (апоптоз, старіння, імунна відповідь тощо), так і патологічних процесах; на особливу увагу заслуговують дослідження ролі лізосомних цистеїнових катепсинів у молекулярних механізмах канцерогенезу [15]. Вважають, що рівні активності цистеїнових катепсинів у різних тканинах, органах і біологічних рідинах можна використовувати як незалежні прогностичні та діагностичні показники перебігу хвороби [12]. За зміною активності тканинних лізосомних цистеїнових катепсинів у крові стає можливим визначення ступеня катаболізму білків і з'ясування ролі протеолізу у розвитку та перебігу пухлинного процесу [9, 14].

Метою даної роботи було визначити рівні активності однієї з найпотужніших цистеїнових протеїназ лізосом – катепсину L – у плазмі крові хворих із онкологічними захворюваннями щитоподібної залози та з'ясувати діагностичне значення даного показника для терапії даної патології ЩЗ.

Об'єктом дослідження була плазма крові хворих (віком 35–70 років) із доброякісними (вузловий еутиреоїдний зоб) та злоякісними (папілярний і фолікулярний рак) пухлинами щитоподібної залози. Матеріал для дослідження отримували під час операції у Лор-онкологічному відділенні Обласної клінічної лікарні ім. Мечнікова, там же пухлини типували за гістоструктурою, гістогенезом і ступенем злоякісності, а також проводили дослідження по визначенню рівня тиреоїдних гормонів у плазмі крові хворих. Активність катепсину L визначали по відношенню до азоказеїну (1%), денатурованого сечовиною (3,0 M) в 1,0 мл інкубаційної суміші з 15 хв преінкубацією ферменту в присутності 2 mM 2-меркаптоетанолу і 1 mM Na₂EDTO, і виражали в умовних одиницях згідно з інтенсивністю абсорбції при довжині хвилі 366 нм на 1 мг білка за 1 хв [8]. Визначення загальної кількості білка проводили за методом Бредфорд [10]. Статистичну обробку результатів виконували з використанням комп'ютерної програми *Excel* згідно з *t*-критерієм Стьюдента.

У сироватці крові містяться клітинні ферменти, які потрапляють до неї з тканин унаслідок фізіологічного старіння і відмирання клітин або змін проникності клітинних мембран [12]. За даними Веремєєнко [1], протеїнази з пухлинних клітин *in vivo* здатні руйнувати нормальну архітектуру тканин, полегшуючи інфільтрацію пухлинних клітин до тканин хазяїна. Кислі протеїнази, зокрема цистеїнові катепсини, які секретують пухлинні тканини в інтерстиціальну рідину, здатні руйнувати первинні мембранні капіляри, сприяючи проникненню ракових клітин через стінки судин до тканин хазяїна та формуванню метастазів.

Результати визначення рівня активності лізосомного цистеїнового катепсину L представлені на рис. 1. Нами показано, що в плазмі крові хворих із онкологічними захворюваннями ЩЗ рівень активності катепсину L при доброякісних захворюваннях ЩЗ імовірно не відрізнявся від показника у нормі. При злоякісних формах захворювання активність катепсину L у плазмі крові хворих перевищувала в 3,6 разу значення контрольного показника.

Зростання рівня активності тканинного лізосомного цистеїнового катепсину L у плазмі крові хворих свідчить про наявність цитолітичних процесів у злоякісних клітинах, які можуть бути обумовлені як порушенням проникності мембран субклітинних структур, так і

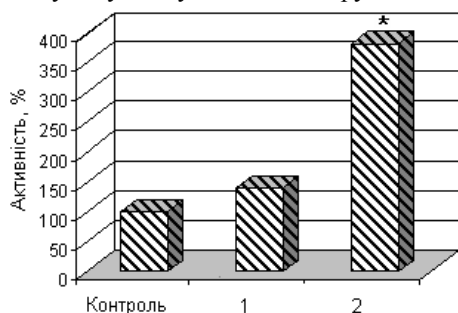


Рис. 1. Активність цистеїнового катепсину L у плазмі крові хворих із онкологічними захворюваннями ЩЗ (M±m): 1 – у доброякісних пухлинах ЩЗ (n=10); 2 – у злоякісних пухлинах ЩЗ (n=21).

лабілізацією плазматичної мембрани. Крім того, за даними літератури, зміни активності цистеїнових катепсинів спричинюють порушення механізмів активації та регуляції функціонування цих протеолітичних ферментів і зміни синтезу й експресії цих ферментів, що мають місце за канцерогенезу. За результатами Shuja, в клітинах пухлинних тканин хворих із карциномою щитоподібної залози збільшується як концентрація катепсину B, так і рівень його активності [16]. Kawamata et al. в експериментах на безтимиусних мишах продемонстрували, що сквамозні ракові клітини ротової порожнини (ВНУ), виділені з неметастазуючих ракових пухлин, експресують прокатепсин L.

Враховуючи те, що ці клітини здатні проникати до нижньощелепної кісткової тканини, було зроблене припущення, що катепсин L є важливою протеїназою в інвазивних процесах сквамозних ракових клітин ротової порожнини до кісткової тканини [13].

Відомо, що підтримування нормального функціонування ЩЗ базується на двосторонньому шляху секреції та захоплення тиреоглобуліну (ТГ) [11]. Щойно синтезований ТГ транспортується вздовж секреторного шляху до апікальної мембрани тиреоїдних епітеліальних клітин, де за допомогою тиропероксидази стає йодованим і відбувається формування тиреоїдних гормонів. Після екзоцитозу ТГ накопичується в екстрацелюлярному просвіті тиреоїдних фолікул у ковалентно перехреснозв'язаній формі. Молекулярна природа міжмолекулярного ковалентного перехресного зв'язку є видозалежною. Глобули ТГ людини, як правило, перехреснозв'язані дисульфідними містками. Fredrichs et al. запропонували схему послідовних протеолітичних подій, які призводять до деградації ТГ за участю цистеїнових катепсинів в епітеліальних клітинах ЩЗ (рис. 2) [11]. Оскільки ковалентно перехреснозв'язані глобули ТГ можуть дорівнювати у діаметрі 120 мкм, необхідною передумовою для сольобілізації ТГ з цих глобул є їх протеоліз, який відбувається за безпосередньою участю катепсинів В та L. Після ендоцитозу ТГ тиреоїдними епітеліальними клітинами накопичений в екстрацелюлярному матриксі ТГ підлягає частковому протеолізові, в якому також беруть участь цистеїнові катепсини та який призводить до звільнення гормонів Т₄. Інтерналізований ТГ досягає ендосом і лізосом, де також за участю цистеїнових катепсинів відбувається повна його деградація [11]. Таким чином, за умов нормального функціонування ЩЗ, цистеїнові катепсини беруть безпосередню участь у деградації ТГ *in vivo*.

При дослідженні вмісту тиреоїдних гормонів у плазмі крові хворих з онкологічними захворюваннями ЩЗ встановлено, що кількість трийодтироніну та тироксину в плазмі крові хворих як з доброякісними так і зі злроякісними пухлинами ЩЗ, ймовірно не відрізняється від контрольних показників, тоді як концентрація тиреотропного гормону зростає та ймовірно перевищує у 7,35 разу вміст даного гормону в контролі (табл.) [7].



Рис. 2. Схематичне зображення послідовностей протеолітичних подій за участю лізосомних цистеїнових катепсинів, які призводять до деградації ТГ в епітеліальних клітинах ЩЗ, запропоноване Fredrichs [11]

Вміст тиреоїдних гормонів у плазмі крові хворих із онкологічними захворюваннями ЩЗ (M±m)

Гор- мони ЩЗ \ Назва захворювання	Контроль (n=30)	Доброякісні за- хворювання ЩЗ (n=10)	Злоякісні захво- рювання ЩЗ (n=21)
Тироксин, %	11,64±0,45	11,95±2,02	14,49±2,13
Трийодтиронін, %	1,31±0,06	1,44±0,23	1,80±0,33
Тиреотропний гормон, %	2,1±0,2	8,7±4,6	15,7±6,3*

Примітка. * – $p < 0,05$ щодо контрольних показників.

З даних літератури відомо, що катепсин L є однією з найактивніших цистеїнових протеїназ і уособлює в собі більшу частину лізосомної цистеїнової протеолітичної активності [15]. Встановлено, що ген катепсину L активується різноманітними факторами росту та деякими онкогенами. В NIH3T3 клітинах (мишині ембріональні фібробласти) ген катепсину L активується еритроцитарним фактором росту (PDGF), епідермальним фактором росту (EGF), cAMP та онкогенами, включаючи гени *v-ras*, *v-src* та *v-mos*. Активність ферменту регулюється специфічно ендogenous інгібіторами родини цистатинів, тіропінами та фрагментом p41 інваріантного ланцюга [17]. Згідно зі схемою каскаду протеолітичних подій деградації ТГ, катепсин L залучений до всіх етапів процесингу гормонів [11]. Можливо, підвищення активності цього ферменту, внаслідок порушень регуляторних механізмів, стає однією з причин зростання вмісту тиреотропного гормону та характеризує зміни в характері гормоноутворення ЩЗ при злоякісній формі захворювання ЩЗ.

Таким чином, на основі порівняльних досліджень рівня активності лізосомного цистеїнового катепсину L, визначеного в плазмі крові хворих із пухлинами щитоподібної залози та вмістом тиреоїдних гормонів, встановлено, що зростання концентрації тиреотропного гормону може бути наслідком підвищеної активності катепсину L, який бере безпосередню участь у деградації тиреоглобуліну – основного білка щитоподібної залози. Зміни активності даного ферменту свідчать про порушення протеолізу, проникності мембран лізосом тироцитів за пухлинної трансформації щитоподібної залози.

Встановлені зміни активності лізосомного цистеїнового катепсину L у плазмі крові хворих із пухлинами щитоподібної залози можуть бути об'єктивними показниками реакції організму на розвиток пухлини, її інвазію у навколишнє середовище та відображати порушення протеолізу при пухлинній трансформації клітин щитоподібної залози. Зміни в характері активності даного ферменту, визначені в плазмі крові хворих з доброякісними та злоякісними пухлинами щитоподібної залози, можуть бути використані як додатковий діагностичний критерій оцінки ступеня тяжкості захворювання даного органа.

1. *Веремеєнко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И.* Протеолиз в норме и при патологии. К.: Здоров'я, 1988. 200 с.
2. *Зюков О., Губарь И.* Онкологическая ситуация в Украине за период 1990–2001 гг. // Гл. врач. 2002. № 11. С. 20–22.
3. *Іпатов А. В.* Оцінка здоров'я населення України і вивчення основних причин потенційних втрат життя // Гл. врач. 2002. № 3. С. 13–18.
4. *Леха В., Рингач Н., Тешенко В.* Стан здоров'я населення України. Рівність і справедливність в охороні здоров'я // Гл. врач. 2005. № 7. С. 29–36.
5. *Лібанова Е. М.* Новітні тенденції смертності населення України // Демографія та соціальна економіка. 2006. № 1. С. 23–37.

6. Міронова Ю. А., Коваленко Ю. М. Мамографія в Україні: сьогодення та майбутнє // Радіол. вісн. 2006. № 3. С. 21–23.
7. Чорна В. І., Лянна О. Л., Лутай Н. В. та ін. Визначення рівнів активності цистеїнових катепсинів, тиреоїдних гормонів та деградації фібронектину при канцерогенезі щитоподібної залози // XI з'їзд онкологів України. Судак, 2006. С. 65.
8. Чорна В. І. Цистеїнові катепсини в умовах променевого ураження та злоякісного росту: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. К., 2001. 298 с.
9. Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers // Clinica Chimica Acta. 2004. Vol. 342. P. 41–69.
10. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
11. Friedrichs B., Tepel C., Reinheckel T. et al. Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L // J. Clin. Invest. 2003. Vol. 111. N 11. P. 1733–1745.
12. Jedeszko C., Sloane B. Cysteine cathepsins in human cancer // Biol. Chem. 2004. Vol. 385. P. 1017–1027.
13. Kawamata H., Nakashiro K., Uchida D. et al. Possible contribution of active MMP-2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L to Bone invasion of newly established oral-squamous-cancer cell lines // Int. J. Cancer. 1997. Vol. 70. P. 120–127.
14. Kos J., Lah T. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: Target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer // Oncol. Rep. 1998. Vol. 5. P. 1349–1361.
15. Mohamed M., Sloane B. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer // Nature. 2006. Vol. 6. P. 764–775.
16. Shuja S., Cai J., Iacobuzio-Donahue C. et al. Cathepsin B activity and protein levels in thyroid carcinoma. Graves' disease, and multinodular goiters // Thyroid. 1999. Vol. 9. P. 569–577.
17. Turk B., Bieth J. G., Bjork I. et al. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1995. Vol. 376. P. 225–230.

ROLE OF PROTEOLYSIS IN THYROID HORMONOPOESIS IN CARCINOGENESIS

V. Chorna*, O. Lyanna*, M. Khvorostenko**, O. Brazaluk**

*Dnipropetrovsk National University

13, Naukova St., Dnipropetrovsk 49050, Ukraine

**Dnipropetrovsk State Medical Academy

9, Dzerzhynskiy St., Dnipropetrovsk 49050, Ukraine

It is well known that lysosomal cysteine cathepsins participate in carcinogenesis of different nosology. But it is still unclear about their role in development of thyroid oncological pathology. The aim of the work was the investigation of lysosomal cysteine cathepsin L activity in blood plasma of patients with benign and malignant thyroid tumors and finding out this enzyme role in thyroid hormonopoiesis. It was obtained that the cathepsin L activity level increase in blood plasma of patients with malignant thyroid tumors could testify to proteolytic disturbance during malignant transformation of thyrocytes, leading to alterations of hormonopoiesis in thyroid carcinogenesis.

Key words: lysosomal cysteine cathepsins, carcinogenesis, thyroid, blood plasma, thyroid hormones.

Стаття надійшла до редколегії 21.02.08

Прийнята до друку 03.03.08