

# ВПЛИВ РАДІОЙОДТЕРАПІЇ НА СТАН СИСТЕМИ ПРОТЕОЛІЗУ ЗА КАНЦЕРОГЕНЕЗУ ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ

*У роботі досліджені зміни рівнів активності лізосомних цистеїнових катепсинів В та L у плазмі крові та післяопераційному матеріалі хворих із доброякісними (вузловий еутиреоїдний зоб) та злоякісними (папілярна карцинома I та II стадії) пухлинами щитовидної залози (ЩЗ) та зміни концентрації тиреоїдних гормонів у плазмі крові цих хворих на фоні проведення терапевтичних заходів, зокрема застосування радіойодтерапії. Показано, що при папілярній карциномі ЩЗ у післяопераційному матеріалі хворих рівні активності лізосомних катепсинів В та L зростають з вираженою залежністю від стадії захворюваності. Припущено, що визначений у плазмі крові хворих із папілярною карциномою високий рівень активності катепсину L асоційований з метаболічними порушеннями, які призводять до підвищення рівня тиреотропного гормону.*

**Ключові слова:** радіойодтерапія, цистеїнові катепсини, щитовидна залоза, канцерогенез.

*В работе исследованы изменения уровней активности лизосомных цистеиновых катепсинов В та L в плазме крови и в послеоперационном материале больных с доброкачественными (узловой еутиреоидный зоб) и злокачественными (папиллярная карцинома I та II стадии) опухолями щитовидной железы.*

**Ключевые слова:** радиойодтерапия, цистеиновые катепсины, щитовидная железа, канцерогенез.

*There were researched both the changes of cathepsin L and B activities levels in blood plasma and postoperative material of patients with benign (nodular euthyroid goitre) and malignant (papillary carcinoma I and II stages) thyroid tumors and the changes of thyroid hormones concentration in blood plasma of these patients during therapy particularly radioiodine therapy. It was shown that in case of papillary carcinoma lysosomal cysteine cathepsins B and L activities levels were found increased with dependence of stage disease in postoperative materials. It was supposed that the high cathepsin L activity level observed in blood plasma of patients with papillary carcinoma was associated with metabolic disturbances which lead to increasing of thyroid hormones concentration.*

**Key words:** radioiodine therapy, cysteine cathepsins, thyroid, carcinogenesis.

## Вступ

По відношенню до всіх онкологічних захворювань, рак щитовидної залози (РЩЗ) складає лише 1,5%, але за останні декілька років спостерігається підвищення захворюваності на РЩЗ на фоні зниження смертності від даної патології [1]. Це пов'язано з розпізнаванням захворювання на ранніх стадіях, на яких найбільш сприятливий прогноз реалізується після хірургічного втручання у комплексі з терапією радіоактивним йодом.

Тотальне хірургічне видалення щитовидної залози (ЩЗ) – перший крок у лікуванні раку щитовидної залози. Застосування радіоактивного йоду показано як для абляції залишків тканини ЩЗ після видалення органу з приводу багатофокусного, інвазивного раку, так і для лікування регіонарних та віддалених метастазів диференційованого РЩЗ [2]. Як відомо, у сучасній медичній практиці найбільшого поширення набуло використання радіоактивного ізотопу йоду I-131, а радіотерапія захворювань щитовидної

залози заснована на механізмі активного транспорту I-131 із крові через Na-I симпортер до фолікулярного епітелію ЩЗ, накопичення його у фолікулах у зв'язаному з тиреоглобуліном вигляді та секреції з ефективним періодом напіввиведення за декілька днів. Завдяки здатності клітин щитовидної залози та високодиференційованих пухлин і їх метастазів селективно поглинати йод, концентрація I-131 в цих тканинах стає у декілька разів вищою ніж концентрація його в крові. Руйнуючу дію I-131 викликають бета-частки, які мають невелику довжину пробігу у тканинах. Ізотоп I-131, що накопився в тканинах викликає іонізацію молекул, продукцію великої кількості вільних радикалів або короткоживучих токсичних отруг, здатних пошкодити життєво важливі біологічні структури, такі як ДНК та ферменти. Всі ці події призводять до затримки поділу та загибелі клітин ЩЗ та/або пухлини [2]. Відомо, що серед усіх видів онкологічних захворювань ЩЗ, папілярний рак найбільш поширений [3]. Сучасними біохімічними та клініко-біохімічними дослідженнями було показано, що серед багатьох біомаркерів папілярної карциноми ЩЗ, лізосомні цистеїнові протеази – катепсин В (КФ 3.4.22.1) та катепсин L (КФ 3.4.22.15), привертають особливу увагу. Вважають, що рівні активності цистеїнових катепсинів у різних тканинах, органах та біологічних рідинах можна застосовувати в якості незалежних прогностичних показників перебігу хвороби [4]. По зміні активності тканинних лізосомних катепсинів у крові можливо визначити ступінь катаболізму білків і роль протеолізу у розвитку та перебігу пухлинного процесу, оскільки зміни активності катепсинів мають різну спрямованість на різних стадіях канцерогенезу [5]. Встановлено, що високий рівень активності катепсину В у сироватці крові корелює із низькою тривалістю життя хворого на рак [6].

Метою даної роботи було дослідження змін рівнів активності лізосомних цистеїнових катепсинів В та L у плазмі крові та післяопераційному матеріалі тканин хворих із доброякісними і злоякісними (папілярна карцинома ЩЗ (I та II стадії)) пухлинами щитовидної залози у наступних групах: 1 – контроль; 2 – до операції; 3 – після операції; 4 – до радіойодтерапії; 5 – після радіойодтерапії; а також визначення рівнів тиреоїдних гормонів у плазмі крові хворих та з'ясування ролі лізосомних

цистеїнових катепсинів, як у розвитку онкологічного захворювання ЩЗ, так і в адаптивних перебудовах білкового метаболізму у відповідь на проведену радіойодтерапію.

#### Методика досліджень

Об'єктом дослідження була плазма крові та післяопераційний матеріал хворих (віком 35-70 років) з доброякісними (багатовузловий еутиреоїдний зоб) та злоякісними (папілярний рак I та II стадії, T2N0M0) пухлинами щитовидної залози. Плазму крові для дослідження отримували до операції, через тиждень після операції, до радіойодтерапії та через тиждень після радіойодтерапії у відділенні ендокринної хірургії Обласної клінічної лікарні ім. Мечнікова, там же пухлини типували за гістоструктурою, гістогенезом та ступенем злоякісності, а також проводили дослідження по визначенню рівня тиреоїдних гормонів у плазмі крові хворих. Контрольну групу склали показники рівнів активності катепсинів, визначені в плазмі крові донорів (n = 30).

Післяопераційний матеріал пухлин щитовидної залози отримували під час операції. Всі операції з тканинами щитовидної залози проводили при 0 – + 4 °С. Гомогенати готували в співвідношенні 1:9 на 0,025 М трис-НСІ буфері (рН 7,4), що вміщував 1 мМ ЕДТО та 0,15 М NaCl. Активність катепсинів В та L визначали в 1,0 мл інкубаційної суміші з 15 хв преінкубацією ферменту в присутності 2 мМ 2-меркаптоетанолу (2 ME) і 1 мМ Na<sub>2</sub>EDTO [14], і виражали в умовних одиницях згідно з інтенсивністю абсорбції при довжині хвилі 383 нм та 366 нм за 1 хв відповідно. Активність катепсину В встановлювали відносно субстрату N,α-бензоіл-D,L-аргінін-p-нітроаніліду (FluKa, Switzerland). Активність катепсину L визначали по відношенню до азоказеїну (1 %), денатурованого сечовиною (3,0 М) [7]. Кількісну оцінку загального білка в пробах проводили за методом Бредфорд [8]. Статистичну обробку результатів виконували з використанням комп'ютерної програми Excel відповідно до t- критерію Ст'юдента.

#### Результати та їх обговорення

Дані, отримані при дослідженні рівнів активності цистеїнових катепсинів В та L, які відбуваються у післяопераційному матеріалі хворих із доброякісними та злоякісними пухлинами ЩЗ представлені на рис. 1 (А, Б).

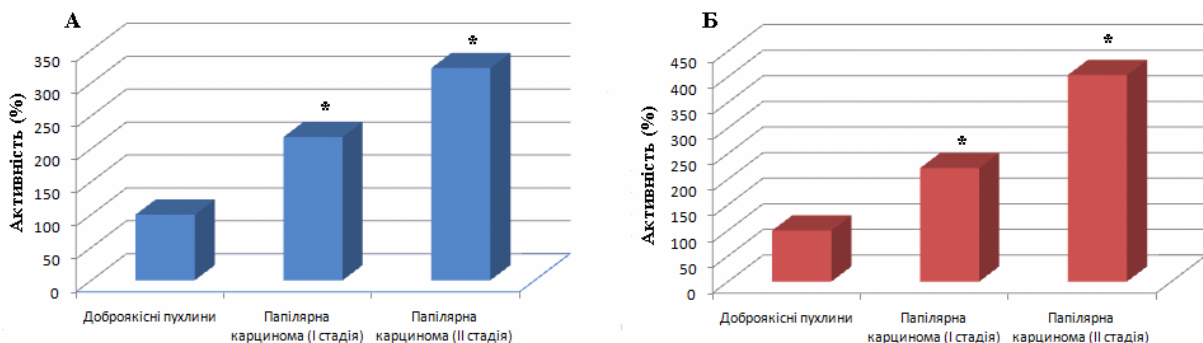
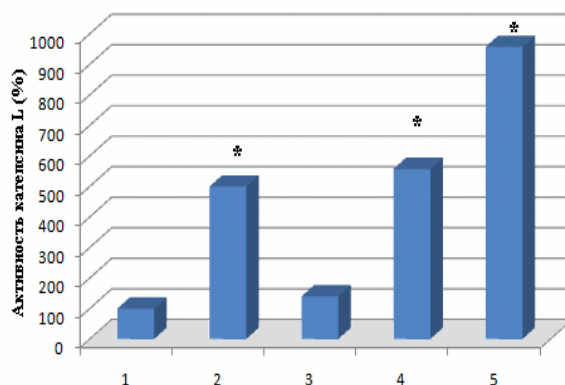


Рис. 1. Рівні активності лізосомних цистеїнових катепсинів В (А) та L (Б) у післяопераційному матеріалі хворих із добро- (n = 18) та злоякісними пухлинами (n = 22) щитовидної залози

Показано, що після хірургічного втручання, у порівнянні з показниками рівнів активності у доброякісних пухлинах ЩЗ, в тканинах злоякісних пухлин щитовидної залози встановлено підвищення рівнів активності досліджуваних катепсинів, яке зростало зі ступенем злоякісності пухлини. Високий рівень активності катепсинів у клітинах злоякісних пухлин ЩЗ спричинюють такі фактори: підвищення синтезу та концентрації катепсинів [9]; порушення регуляції активності катепсинів їх ендogenous інгібіторами [10]; зміни фізико-хімічних властивостей цистеїнових пептидгідролаз у злоякісних клітинах ЩЗ. На користь останнього фактору свідчать результати досліджень, проведених нами, по вивченню фізико-хімічних властивостей цистеїнових катепсинів, виділених та очищених зі злоякісних пухлин (папілярної та фолікулярної карцином) ЩЗ [11], оскільки за змінами  $V_{max}$ ,  $K_M/K_{ув}$  та кінетики каталізу було виявлено відмінності у специфічності цистеїнових катепсинів В та L у злоякісних пухлинах ЩЗ.

Як відомо, в сироватці крові містяться клітинні ферменти, які потрапляють до неї з тканин унаслідок фізіологічного старіння і відмирання клітин або змін проникності клітинних мембран [12]. Відомо, що 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. За даними клінічних досліджень активності цистеїнового катепсину В у плазмі крові хворих як із доброякісними, так і злоякісними пухлинами ЩЗ показано, що вірогідних змін активності даного ферменту у порівнянні з контрольними показниками не відбувається. Таким чином, проведення терапевтичних заходів не відбивається на рівні активності досліджуваного катепсину. Результати визначення рівня активності лізосомного цистеїнового катепсину L представлені на рис. 2. Нами показано, що в плазмі крові хворих із онкологічними захворюваннями ЩЗ рівень активності катепсину L при доброякісних захворюваннях ЩЗ вірогідно не відрізнявся від показника у нормі. Активність лізосомного цистеїнового катепсину L у плазмі крові хворих із папілярною карциномою ЩЗ визначена підвищеною на всіх етапах спостереження (рис. 2). Зокрема, на момент встановлення діагнозу активність досліджуваного ферменту у 5 разів перевищувала контрольний показник. Визначене зростання рівня активності тканинного лізосомного цистеїнового катепсину L у плазмі крові хворих свідчить про розвиток цитолітичних процесів у злоякісних клітинах, які можуть бути обумовлені як порушенням проникності мембран субклітинних структур, так і лабілізацією плазматичної мембрани. Крім того, за даними літератури, зміни активності цистеїнових катепсинів спричинюють порушення механізмів активації та регуляції функціонування цих протеолітичних ферментів та зміни синтезу та експресії цих ферментів, що мають місце за канцерогенезу.



**Рис. 2.** Активність лізосомного цистеїнового катепсину L у плазмі крові хворих із папілярною карциномою ЩЗ ( $M \pm m$ ,  $n = 22$ ): 1 – контроль; 2 – до операції; 3 – після операції; 4 – до радіодотерапії; 5 – після радіодотерапії.  $p < 0,05$  відносно контрольного показника

Показано, що рівень активності катепсину L залежить від терміну спостереження та набуває максимального значення після проведення курсу радіодотерапії (рис. 2). Припущено, що отримані показники активності даного катепсину викликані порушеннями функціонування тироцитів, викликаних накопиченням радіоактивного йоду в клітинах ЩЗ. Відомо, що при застосуванні I-131 променева доза на все тіло складається із гамма-випромінювання, яке випускається від накопичення радіонукліду у щитовидній залозі та крові [2]. Результатами сучасних радіобіологічних досліджень

визначено, що при дії низьких рівнів іонізуючого випромінювання важливу роль у виникненні радіаційних реакцій відіграють пошкодження мембранних структур, що забезпечують життєдіяльність клітини. Порушення внутрішньоклітинної компартменталізації протеолітичних ферментів (особливо з лізосомною локалізацією) є одним із важливих ланцюгів розвитку променевої патології, тому що порушення проникності лізосомних мембран під впливом випромінювання створює сприятливі умови для виходу катепсинів із лізосом, дезорганізуючи метаболічні процеси в клітині і

посилюючи первинні радіаційні зрушення. Отримане збільшення активності досліджуваного ферменту вказує на ймовірне посилення деструктивних процесів у клітинах тканин організму та посиленням цитолітичного ефекту внаслідок дії радіоактивного йоду.

З даних літератури відомо, що катепсин L є однією з найактивніших цистеїнових протеїназ та уособлює в собі більшу частину лізосомної цистеїнової протеолітичної активності [10]. Від-

повідно до схеми каскаду протеолітичних подій деградації тиреоглобуліну (рис. 3), катепсин L залучений до всіх етапів процесінгу гормонів [13]. Можливо, що підвищення активності цього ферменту, внаслідок порушень регуляторних механізмів, і зокрема, накопичення радіоактивного йоду, стає однією з причин зростання вмісту тиреотропного гормону та характеризує зміни в характері гормоноутворення ЩЗ при злоякісній формі захворювання ЩЗ.



**Рис. 3.** Схематичне зображення послідовностей протеолітичних подій за участю лізосомних цистеїнових катепсинів, які призводять до деградації ТГ в епітеліальних клітинах ЩЗ, запропоноване Fredrichs et al [13]

За нашими даними, вміст тиреотропного гормону в плазмі крові хворих визначений підвищеним на кожному етапі спостереження з

вираженою тенденцією до зростання даного показника на наступних етапах спостереження (табл. 1 та 2).

Таблиця 1

**Вміст тиреоїдних гормонів у плазмі крові хворих з папілярною карциномою (I стадія) ЩЗ (M ± m)**

Назва захворювання Гормони ЩЗ	Контроль (n = 30)	Злоякісні захворювання ЩЗ (n = 10)			
		До операції	Після операції	До радіоїодотерапії	Після радіоїодотерапії
Тироксин (%)	11,64 ± 0,45	15,75 ± 0,94*	8,48 ± 0,50*	2,07 ± 0,16	2,74 ± 0,32*
Трийодтиронін (%)	1,31 ± 0,06	2,69 ± 0,89	1,26 ± 0,15*	1,04 ± 0,25	1,92 ± 0,73
Тиреотропний гормон (%)	2,1 ± 0,2	2,49 ± 0,96	30,27 ± 8,64	103,59 ± 2,10*	107,40 ± 1,09*

\* – p < 0,05 по відношенню до контрольних показників

Таблиця 2

**Вміст тиреоїдних гормонів у плазмі крові хворих з папілярною карциномою (II стадія) ЩЗ (M ± m)**

Назва захворювання Гормони ЩЗ	Контроль (n = 30)	Злоякісні захворювання ЩЗ (n = 11)			
		До операції	Після операції	До радіоїодотерапії	Після радіоїодотерапії
Тироксин (%)	11,64 ± 0,45	10,65 ± 0,88*	9,12 ± 1,58	1,83 ± 0,26*	3,15 ± 0,73
Трийодтиронін (%)	1,31 ± 0,06	2,10 ± 0,52	0,64 ± 0,16	1,63 ± 0,34	1,24 ± 0,46
Тиреотропний гормон (%)	2,1 ± 0,2	4,76 ± 2,45	9,15 ± 5,90	51,55 ± 16,06	64,00 ± 19,00

\* p < 0,05 по відношенню до контрольних показників

Показано, що найвищого рівня вміст ТТГ досягає через тиждень після проведення радойодотерапії та у 51 та 32 рази перевищує контрольні показники при папілярній карциномі ЩЗ I та II стадії тяжкості відповідно. Вміст інших гормонів ЩЗ – тироксину та трийодтироніну – мали різноспрямований характер на визначених етапах дослідження (табл. 1 та 2).

Таким чином, за канцерогенезу щитовидної залози відбувається підвищення рівнів активності лізосомних цистеїнових катепсинів В та L у тканинах щитовидної залози, яке супроводжується змінами активності лізосомного цистеїнового катепсину L у плазмі крові хворих на фоні збільшення концентрації тиреоїдних гормонів. Припущено, що зростання концентрації тирео-

тропного гормону може бути наслідком підвищеної активності катепсину L, який бере безпосередню участь у деградації тиреоглобуліну – основного білка щитовидної залози. Зміни активності даного ферменту свідчать про порушення протеолізу,

проникності мембран лізосом тироцитів та змін фізико-хімічних властивостей досліджуваних ферментів, які відбуваються за пухлинної трансформації щитовидної залози.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Hodgson N.C., Button J., Solorzano C.C. Thyroid cancer: is the incidence still increasing? // *Annals of Surgical Oncology*. – 2004. – Vol.11. – P. 1093-1097.
2. Гарбузов П.И., Дроздовский Б.Я., Родичев А.А., Тимохина О.В., Подольхова Н.В. Радиотерапия рака щитовидной железы // *Практическая онкология*. – Т. 8, № 1. – 2007. – С. 420-45.
3. Романчишен А.Ф., Романчишен Ф.А., Каопатовский И.В. Направления изменений тактики хирургического лечения больных раком щитовидной железы: анализ 30 летнего опыта одного коллектива // *Современные аспекты хирургического лечения эндокринной патологии*. – Киев, 2006. – С. 14-16.
4. Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers // *Clinica Chimica Acta*. – 2004. – Vol. 342. – P. 41-69.
5. 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.
6. Kos J., Schweiger A. Cathepsins and cystatins in extracellular fluids – useful biological markers in cancer// *Radiol.Oncol.* – 2002. – Vol. 36, № 2. – P. 176-179.
7. Чорна В.І. Цистеїнові катепсини в умовах променевого ураження та злоякісного росту: Дис. ... доктора біол. наук: 03.00.01. – К.: 2001, 298 с.
8. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P.248-254.
9. 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.
10. Dickinson D.P. Cysteine peptidases of mammals: Their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease // *Crit Rev Oral Biol Med.* – 2002. – Vol. 13 – № 3. – P. 238-275.
11. Лянна О.Л. Роль цистеїнових катепсинів у деградації білків при патологічних станах: Дис.... канд. біол.наук: 03.00.04. К.: 2007. 163 с.
12. Jedezsko C., Sloane B. Cysteine cathepsins in human cancer // *Biol. Chem.* – 2004. Vol. – 385. P. 1017-1027.
13. Friedrichs B., Tepel C., Reinheckel T. et al. Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 111, № 11. – P. 1733-1745.

Рецензенти: Томілін Ю.А., д.б.н., професор, Чорноморський державний університет імені Петра Могили;  
Кутлахмедов Ю.О., д.б.н., професор, Інститут клітинної біології та генної інженерії НАН України.

© Лянна О.Л., Чорна В.І., Хворостенко М.І.,  
Дорофєєва Н.А., 2010

*Стаття надійшла до редколегії 18.06.2010 р.*