

9. Танин Л.В. и др. *Лазерная гемотерапия в лечении заболеваний периферической нервной системы.* — Минск: Мэджик Бук, 2004. — 148 с.
10. Москвин С.В. и др. *Лазерная терапия заболеваний мочеполовой сферы.* — Тверь: Триада, 2004. — 160 с.
11. Литвинова Т.М., Истомин Ю.П., Коробцова Г.И. // *Эфферентн. тер.* — 2006. — Т. 12, № 1. — С. 51–54.
12. Москвин С.В., Буйлин В.А. *Основы лазерной терапии.* — Тверь: Триада, 2006. — 256 с.
13. Tyner J. Hode L. *Laser therapy in dentistry and medicine* // J. Tyner. — Stockholm; Sweden: Prima Books, 1996. — 236 p.

О.Л. Лянна, В.І. Чорна, М.І. Хворостенко

Дніпропетровський національний університет  
ім. О.Гончара,

Дніпропетровська державна медична академія

### **Особенности регуляции активности цистеиновых протеаз та визначення їх клінічного значення за канцерогенезу щитоподібної залози** **Peculiarities of cysteine protease activity and determining their clinical significance at thyroid carcinogenesis**

**Summary.** Dynamics of lysosomal cysteine cathepsin L in the blood plasma and post-operative material of the tissues of the patients with benign and malignant thyroid tumors before and after radioiodine therapy was investigated. The role of cathepsin L in degradation of thyroglobulin, main protein of thyroid gland, was established. The difference in the degree of fragmentation of thyroglobulin with isolated and 915 times purified cathepsin L from follicular carcinoma when compared with cathepsin L isolated from papillary carcinoma, which suggest the participation of the investigated fragment in the thyroid hormones processing, was noted.

**Key words:** thyroid gland, cathepsin L, thyroglobulin, carcinogenesis.

**Резюме.** Исследована динамика активности лизосомного цистеинового катепсина L в плазме крови и послеоперационном материале тканей больных с доброкачественными и злокачественными опухолями щитовидной железы до и после проведения радиоiodотерапии. Установлено участие катепсина L в деградации тиреоглобулина — основного белка щитовидной железы. Показано отличие в степени фрагментованности тиреоглобулина выделенным и очищенным в 915 раз катепсином L из фолликулярной карциномы по сравнению с катепсином L, выделенным из папиллярной карциномы, что свидетельствует о вовлечении исследуемого фермента в процессинг гормонов щитовидной железы.

**Ключевые слова:** щитовидная железа, катепсин L, тиреоглобулин, канцерогенез.

**Ключові слова:** щитоподібна залоза, катепсин L, тиреоглобулін, канцерогенез.

Розвиток злоякісних новоутворів є однією із загально-фундаментальних проблем, що інтенсивно вивчаються у сучасній науці та привертають увагу вчених різних спеціальностей. Попри помітний прогрес у розумінні патогенезу, розробці методів діагностики та лікування пухлин в останнє десятиріччя, онкологічна захворюваність продовжує невпинно зростати. У процесі канцерогенезу малігнізована тканина починає виробляти так звані «маркери пухлинної прогресії» — продукти, не властиві нормальним клітинам, але необхідні для реалізації певних властивостей пухлини. Згідно з сучасним уявленням про механізми метастазування для інвазивного росту, інтра- та екстравазації

пухлинним клітинам необхідно подолати перешкоди у вигляді базальних мембран, екстраклітинного матриксу та тканинних структур [1]. Для з'ясування факторів прогнозу пухлинної прогресії та малігнізації клітин передбачається дослідження протеолітичних ферментів, оскільки малігнізовані клітини самостійно або за допомогою стимуляції клітини навколишньою стромною виробляють низку протеолітичних ферментів, кожний з яких в теперішній час претендує на роль фактора прогнозу пухлинної прогресії. Продемонстровано, що генетично індукована надмірна активність катепсину L надає канцерогенні та метастатичні властивості клітинам меланоми [1]. Припускають, що цистеїнові катепсини залучені до формування неосудин, які живлять пухлини [2].

Вважають, що рівні активності цистеїнових катепсинів у різних тканинах, органах та біологічних рідинах можна застосовувати як незалежні прогностичні показники перебігу хвороби [3]. За зміною 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 [4]. Встановлено, що високий рівень активності катепсину В у сироватці крові корелює із малою тривалістю життя хворого на рак [3]. У хворих із колоректальною та маточною карциномою рівні активності катепсину В корелювали з прогресією онкозахворювання [5, 6]. Крім того, концентрація катепсину В при цих патологіях залежала від методів лікування хворих [7]. Встановлено, що в сироватці крові хворих на рак грудної залози, печінки та колоректальний рак активність катепсину L збільшена [3]. Комплекс катепсин — L-інгібітор запропоновано використовувати як діагностичний маркер раку яєчників [8].

Порушення експресії та секреції катепсинів, розподілу у клітині і регуляція їх активності являє собою відмітну рису пухлинних клітин. Патологічна секреція протеолітичних ферментів при злоякісних новоутворах людини призводить до підвищених витрат інгібіторів та порушення регуляції лізосомного протеолізу. Проблема участі протеаз у процесах росту та поширенні пухлин залишається до кінця не з'ясованою. Не вивчено залежність активності цистеїнових протеаз від конкретної нозології, не описано динаміки цих показників у перебігу пухлинної прогресії. Не визначено змін протеолітичної активності організму, що відбуваються при лікуванні.

Метою даної роботи було визначення рівнів активності лізосомного цистеїнового катепсину L у плазмі крові та післяопераційному матеріалі тканин хворих із добро- і злоякісними пухлинами щитоподібної залози у таких групах: 1 — контроль; 2 — до операції; 3 — після операції; 4 — до йодотерапії; 5 — після йодотерапії; а також дослідження фізико-хімічних властивостей цистеїнового катепсину L з пухлин щитоподібної залози (ЩЗ) та його здатності гідролізувати тиреоглобулін для з'ясування ролі лізосомних цисте-

їнових катепсинів, як у розвитку онкологічного захворювання ЩЗ, так і в адаптивних перебудовах білкового метаболізму.

Об'єктом дослідження була плазма крові та післяопераційний матеріал хворих (віком 35–70 років) із доброякісними (вузловий еутиреоїдний зоб) та злоякісними (папілярний та фолікулярний рак) пухлинами ЩЗ. Матеріал для дослідження отримували до операції, через тиждень після неї, до радіоїодотерапії та через тиждень після радіоїодотерапії у ЛОР-онкологічному відділенні Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І.І. Мечнікова, там же пухлини типували за гістоструктурою, гістогенезом та ступенем злоякісності, а також проводили дослідження з визначення рівня тироїдних гормонів у плазмі крові хворих.

Усі операції з тканинами ЩЗ проводили при 0–4 °С. Для визначення активності цистеїнового катепсину L, гомогенати готували в співвідношенні 1 : 9 на 0,025 М у трис-НСІ буфері (рН 7,4), що вміщував 1 мМ Na<sub>2</sub>ЕДТО та 0,15 М NaCl [9]. Активність катепсину L визначали по відношенню до азоказеїну (1%), денатурованого сечовиною (3,0 М) в 1,0 мл інкубаційної суміші з 15 хв преінкубацією фермента в присутності 2 мМ 2-меркаптоетанолу і 1 мМ Na<sub>2</sub>ЕДТО, і виражали в умовних одиницях згідно з інтенсивністю абсорбції при довжині хвилі 366 нм на 1 мг білка за 1 хв [10]. Виділення та очистку лізосомного цистеїнового катепсину L проводили згідно зі схемою [11].

Визначення загальної кількості білка проводили за методом Бредфорд [12]. Статистично обробляли результати з використанням комп'ютерної програми Excel згідно з t-критерієм Стьюдента.

Результати досліджень зміни активності лізосомного цистеїнового катепсину L у плазмі крові хворих із добро- та злоякісними пухлинами ЩЗ представлені на рис. 1. Нами показано, що в плазмі крові хворих із доброякісними пухлинами ЩЗ рівень активності катепсину L вірогідно не відрізнявся від контрольного, тоді як при злоякісних пухлинах ЩЗ був підвищеним на 58% порівняно з контрольним показником (див. рис. 1). Активація протеолізу в плазмі крові при

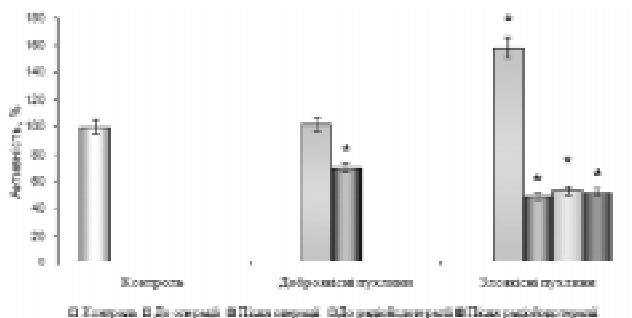


Рис. 1. Активність цистеїнового катепсину L у плазмі крові хворих із доброякісними (n=17) та злоякісними (n = 21) пухлинами ЩЗ (M ± m), \* p < 0,05 відносно контрольних показників

канцерогенезі ЩЗ може бути наслідком надмірної активації лізосомних протеїназ, вивільнення їх з клітин тканини залози, а також зниження інгібіторного потенціалу за канцерогенезу ЩЗ [13].

Показано, що після проведення операції з видалення пухлини рівень активності катепсину знижується на 30% при доброякісних захворюваннях ЩЗ, та у 1,4 рази — при злоякісних новоутворах ЩЗ порівняно із доопераційним показником. При проведенні курсу радіоїодотерапії при лікуванні злоякісних захворювань ЩЗ встановлено, що рівень активності катепсину L у плазмі крові хворих підвищувався на 3,3% порівняно з післяопераційними показниками, що свідчило про тенденцію спрямування рівня активності катепсину L до контрольних показників.

У післяопераційному матеріалі тканин хворих встановлено, що при злоякісних захворюваннях ЩЗ рівень активності катепсину L у 2,7 рази вищий, ніж при доброякісних (рис. 2). Відомо, що активація лізосомного цистеїнового катепсину при пухлинній трансформації доцільна і спрямована на адаптивну перебудову метаболізму і ультраструктур клітини, і тільки надмірна лабілізація мембран лізосом може спричинити вихід у цитозоль катепсину L, який далі потрапляє у зовнішнє середовище та кров. Ймовірно, виявлені зміни протеолітичної активності досліджуваного фермента можуть бути однією з причин порушення механізму транспорту та обмеженого протеолізу прогормону тиреоглобуліну. Таке припущення може бути доцільним та пояснювати підвищену кількість цього глікопротеїну при злоякісних формах онкологічного захворювання щитоподібної залози, яка використовується в сучасній клінічній діагностиці як прогностичний маркер перебігу хвороби.

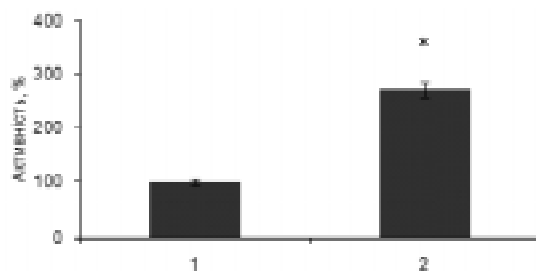


Рис. 2. Активність цистеїнового катепсину L у післяопераційному матеріалі хворих із пухлинами ЩЗ (M ± m): 1 — у доброякісних пухлинах ЩЗ (n = 10); 2 — у злоякісних (n = 21), \* p < 0,05 відносно показників активності у доброякісних пухлинах ЩЗ

Високий рівень активності катепсину L у клітинах злоякісних пухлин ЩЗ можуть спричиняти зміни фізико-хімічних властивостей цистеїнових пептидгідролаз у злоякісних клітинах ЩЗ. На користь даного фактора свідчать результати досліджень, проведених нами, з вивчення фізико-хімічних властивостей цистеїнових катепсинів, виділених та очищених зі злоякісних пухлин (папілярної й фолікулярної карцином) ЩЗ. За допомогою схеми виділення та очистки, яка включала етапи: фракціонування сульфатом амонію,

афінну хроматографію на азоказеїн-сефарозі, гель-фільтрацію на сефадексі G-100 та електрофорез з ДСН в ПААГ, отримано очищені цистеїнові катепсини L з папілярної карциноми ЦЗ людини у 905 разів, та з фолікулярної карциноми у 915 разів відповідно до екстракту.

З'ясувалося, що під дією катепсину L, виділеного та очищеного з папілярної карциноми ЦЗ, зміни швидкості реакції від концентрації субстрату мають характер сигмоїдної залежності, тоді як для катепсину L з фолікулярної карциноми виявляється класична гіперболічна залежність (рис. 3), що може свідчити про підвищену чутливість ферментів до змін концентрації метаболітів, модуляторів активності та можливість алостеричної регуляції даних пептидгідролаз за канцерогенезу ЦЗ. Залучення цистеїнових катепсинів до деградації білків вивчали за гідролізом основного білка тканини ЦЗ — тиреоглобуліну (ТГ) в умовах *in vitro*. Встановлено, що гідроліз ТГ очищеним катепсином L з фолікулярної карциноми ЦЗ відрізняється від деградації ТГ катепсином L з папілярної карциноми ЦЗ і це виявляється в появі фрагментів тиреоглобуліну з молекулярними масами 155, 104, 96 та 61 кДа (рис. 4).

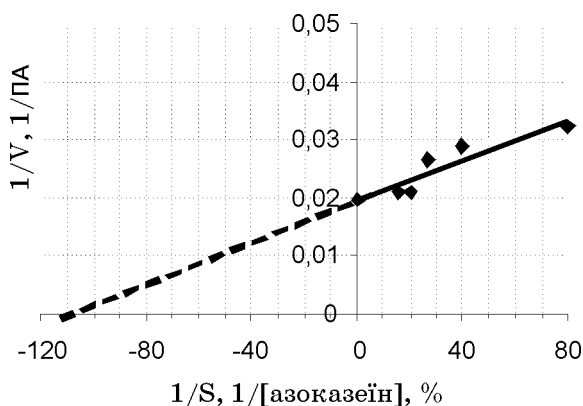


Рис. 3. Застосування зворотних координат Лайнуївера-Берка для визначення кінетики катепсину L з фолікулярної карциноми ЦЗ

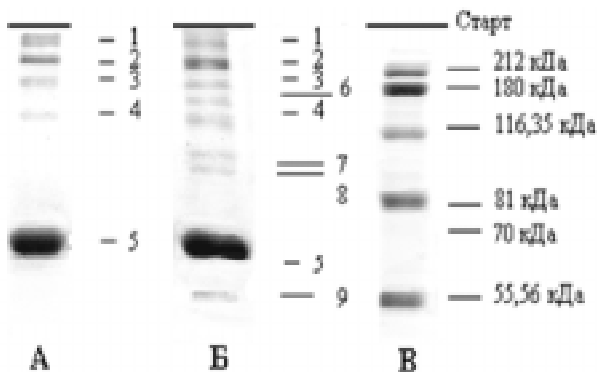


Рис. 4. Деградація ТГ людини очищеними препаратами цистеїнових катепсинів L з пухлин ЦЗ (ЕФ в ПААГ з ДСН): А — катепсином L, виділеним з папілярної карциноми ЦЗ; Б — виділеним з фолікулярної карциноми ЦЗ; В — маркери; 1-14 — продукти деградації з молекулярними масами 321-285 до 61 кДа відповідно

При дослідженні вмісту тироїдних гормонів у плазмі крові хворих з онкологічними захворюваннями ЦЗ, встановлено, що кількість трийодтироніну та тироксину в плазмі крові хворих як з добро- так і злоякісними пухлинами ЦЗ, вірогідно не відрізняється від контрольних показників, тоді як концентрація тиреотропного гормону зростає та вірогідно перевищує у 7,4 разу вміст даного гормону в контролі [14].

З даних літератури відомо, що катепсин L є однією з найактивніших цистеїнових протеїназ та уособлює в собі більшу частину лізосомної протеолітичної активності [15]. Встановлено, що ген катепсину L активується різноманітними факторами росту та деякими онкогенами.

Згідно зі схемою каскаду протеолітичних подій деградації ТГ, катепсин L залучений до всіх етапів процесингу гормонів [16]. Можливо, що підвищення активності даного фермента внаслідок порушень регуляторних механізмів стає однією з причин зростання вмісту тиреотропного гормону та характеризує зміни в характері гормоноутворення ЦЗ при злоякісній формі її захворювання.

Таким чином, з папілярної та фолікулярної карцином ЦЗ отримано цистеїнові катепсини L, визначено їх молекулярні маси (29 кДа). Аналіз фізико-хімічних властивостей виявив відмінності у специфічності цистеїнових катепсинів L у злоякісних пухлинах ЦЗ за змінами  $V_{max}$ ,  $K_M/K_{ув}$  та кінетики каталізу. Методом електрофорезу в ПААГ з ДСН встановлено деградацію тиреоглобуліну цистеїновими катепсинами L, виділеними з папілярної та фолікулярної карцином ЦЗ. Показана відмінність у ступені фрагментованості тиреоглобуліну для катепсину L з фолікулярної карциноми ЦЗ, порівняно із гідролізом ТГ катепсином L з папілярної карциноми, яка проявляється у появі нових фрагментів. Таким чином, на основі порівняльних досліджень рівня активності лізосомного цистеїнового катепсину L, визначеного в плазмі крові хворих із пухлинами ЦЗ та вмістом тироїдних гормонів встановлено, що зростання концентрації тиреотропного гормону може бути наслідком підвищеної активності катепсину L, який бере безпосередню участь у деградації тиреоглобуліну — основного білка ЦЗ. Зміни активності даного фермента свідчать про порушення протеолізу, проникності мембран лізосом тироцитів за пухлинної трансформації ЦЗ та можуть бути об'єктивними показниками реакції організму на розвиток та інвазію пухлини у навколишнє середовище й відображувати порушення протеолізу при пухлинній трансформації клітин ЦЗ.

#### Література

1. Frade R., Rodrigues-Lima F., Huang S. et al. // *Cancer Res.* — Vol. 58. — P. 2733-2736.
2. Kos J., Lah T. // *Oncol. Rep.* — 1998. — Vol. 5. — P. 1349-1361.
3. Kos J., Schweiger. // *Radiol. Oncol.* — 2002. — Vol. 36, № 2. — P. 176-179.
4. Koblinski J. E. // *Clinica Chimica Acta.* — 2000. — Vol. 291. — P. 113-135.
5. Warwas M., Haczynska H., Gerber J. et al. // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* — 1997. — Vol. 35. — P. 301-304.

6. Kos J., Nielsen H.J., Krasovec M. et al. // *Clin. Cancer Res.* – 1998. – Vol. 4. – P. 1511–1516.
7. Bhuvaramurthy V., Govindasamy S. // *Mol. Cell. Biochem.* – 1995. – Vol. 144. – P. 35–43.
8. Nishida Y., Kohno K., Kawatama T. et al. // *Gynecol. Oncol.* – 1995. – Vol. 56. – P. 357–361.
9. Kominami E., Yeno T., Muno D., Katanuma N. // *FEBS.* – 1991. – Vol. 287, № 1/2. – P. 189–192.
10. Чорна В.І. // *Доповіді Національної академії наук України.* – 1999. – № 2. – С. 172–176.
11. Чорна В.І. *Цистеїнові катепсини в умовах променевого ураження та злоякісного росту: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук.* – К., 2001. – 298 – С. 76–77.
12. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
13. Qian K., Chan S., Gong Q. et al. // *Biomed-Biochim. Acta.* – 1991. – Vol. 50, № 4/6. – P. 531–540.
14. Чорна В.І., Лянна О.Л., Лутай Н.В. та ін. // *Матеріали XI з'їзду онкологів України.* – Судак, 2006. – С. 65.
15. Mohamed M., Sloane B. // *Nature.* – 2006. – Vol. 6. – P. 764–775.
16. Friedrichs B., Tepel C., Reinheckel T. et al. // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 111, № 11. – P.1733–1745.

В. Макидон, В. Жовмир, А. Станислав, С. Кябуру  
 Інститут онкології Молдови, Кишинев,  
 Республіка Молдова

## Симультанная термохимиорадиотерапия в предоперационном лечении рака грудной железы Simultaneous thermochemoradiation therapy in pre-operative treatment for breast cancer

**Summary.** The effect of combination of large-fraction radiation therapy, local and total chemotherapy with local electromagnetic therapy was investigated. The question of necessity of complex pre-operative treatment for breast cancer, non-prolonged but locally aggressive courses of treatment is discussed.

**Key words:** breast cancer, radiation therapy, local and total chemotherapy, local UHF-hyperthermia.

**Резюме:** Вивчено ефект поєднання великофракційної променевої терапії, місцевої і загальної хемотерапії з локальною електромагнітною гіпертермією. Дискутується питання про необхідність комплексного передопераційного лікування раку грудної залози, про непролонговані, але місцево агресивні курси лікування.

**Ключові слова:** рак грудної залози, променеве лікування, локальна і загальна хіміотерапія, локальна СВЧ-гіпертермія.

**Ключевые слова:** рак грудной железы, лучевое лечение, локальная и общая химиотерапия, локальная СВЧ-гипертермия.

Каким бы ранним не был рак грудной железы (РГЖ) с клинической точки зрения, биологически он будет поздним. Около 30 % больных во время выявления опухоли уже имеют клинически определяемые отдаленные метастазы. Из оставшихся 70 % около половины могут быть успешно излечены только локальными методами. Остальные 30–35 % больных имеют уже оккультные микрометастазы, 60 % — либо клинические определимые либо доклинические микрометастазы. Не являются исключением случаи РГЖ изначально высокоагрессивные, с бурным ростом, ранним и множественным метастазированием [1], а также присутствием лекарственной резистентности (Ж. Голдие, 1979), которая развивается при кле-

точной популяции  $10^3$ – $10^6$  задолго до того, как опухоль может быть диагностирована клинически  $10^9$  (около 1 см). При первоначальном лечении таких опухолей будет достигнут хороший лечебный эффект, но затем последует рецидив, так как резистентный клон начнет активно развиваться, и произойдет репопуляция опухоли. Тот факт, что мутантные резистентные клоны появляются рано и становятся доминирующими, тогда как чувствительные клетки разрушаются, означает, что пролонгированные курсы не могут быть эффективнее коротких.

Число больных РГЖ, у которых с помощью химиотерапии удается добиться полного исчезновения метастазов, ограничено 5–10 %, а при трансплантации костного мозга или периферических стволовых клеток — 50 %. Среднее время до появления лечебного эффекта обычно составляет 7–14, изредка — до 18 недель. Средняя продолжительность лечебного эффекта 6–12 мес., максимальная — более 15 лет. Скорее всего, это относится и к первичным опухолям. Интересно, что между 1970 и 1980 гг. не зарегистрировано дальнейшего увеличения медианы выживаемости или значений показателей 5-летней выживаемости, несмотря на то, что в это время стала активно использоваться интенсивная химиотерапия [2]. Мы думаем, что, в какой-то мере, эта проблема остается актуальной и по сей день. Чувствуется наличие резистентного клона, который, невзирая на усилия онкологов, не поддается никакому лечению.

Значительное место в арсенале противоопухолевых средств и методов занимает и лучевая терапия. Наиболее значимое исследование в указанном направлении было выполнено на экспериментальных моделях и большой группе чернобыльских ликвидаторов [3]. Установлено, что индивидуальная радиочувствительность обусловлена генетически, и по этому признаку популяции животных (и человека) состоят из 14–20 % радиорезистентных, 10–20 % — радиочувствительных и 7–10 % сверхрадиочувствительных особей. Предельные различия в радиочувствительности могут быть многократными. Результаты этих исследований заставляют вспомнить значительно более ранние данные об индивидуальных различиях радиочувствительности кожи человека, которая может составлять  $\pm 30$  % [4].

До сих пор не удалось найти какого-то универсального подхода в терапии злокачественных новообразований. Успехи в этом направлении связаны, в основном, с применением и совершенствованием мультимодальной терапии. Хотя нет единого, стандартного мнения о методах терапии РГЖ, к лечению заболевания надо относиться со всей ответственностью. С нашей точки зрения это означает, что при операбельном РГЖ должно проводиться комплексное, предоперационное лечение, по возможности максимально агрессивное и, естественно, в кратчайший срок.

Один из компонентов мультимодальной терапии — ионизирующие излучения. Мало у кого вызывает