

Рисунок 4. Порівняння відсоткової глибинної дози лінійного прискорювача Elekta Synergy, виміряного різними детекторами для розміру перетину струменя: а)  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  енергією фотонів — 6 MeB, б)  $10 \times 10 \text{ cm}^2$  енергією фотонів — 6 MeB, в)  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  енергією фотонів — 15 MeB, г)  $10 \times 10 \text{ cm}^2$  енергією фотонів — 15 MeB

центром діода. Тому діоди були зцентровані. На графіку видно, що профілі діодів трішки зміщені від профілів камер ( $\sim 1 \text{ mm}$ ). Для великих полів така мінімальна похибка у позиціонуванні непомітна.

Як видно з графіків, використання іонізаційних камер з великим чутливим об'ємом для вимірювання профілів вузьких полів може вносити велику похибку. Тому для введення в експлуатацію системи планування лікування з IMRT профілів потрібно використовувати дані отримані з допомогою діодного детектора.

На рисунку 4 представлені дані, отримані для відсоткової глибинної дози лінійного прискорювача. З отриманих даних видно, що іонізаційна камера Фармера не може використовуватися для визначення відсоткової глибинної дози вузьких струменів.

Використання сучасних методів доправки дози, таких як IMRT (променева терапія з модуляцією інтенсивності), IGRT (променева терапія під супроводом зображення), SRS (стереотаксична радіохірургія) зумовлюють використання для лікування струмені вужчі  $3 \times 3 \text{ cm}^2$ . Такі струмені називаються вузькими і потребують особливої уваги при проведенні дозиметричних вимірювань та розрахунку дози, оскільки можуть призвести до суттєвих переопроміненнь пацієнтів, що мали місце у Франції [7]. Аналіз літератури та наші вимірювання показують, що найоптимальнішими на сьогодні детекторами для опорної дозиметрії вузьких струменів є діодні детектори.

### Література

1. Das I.J., Ding G.X., Ahnesjo A. // *Med. Phys.* – 2008. – Vol. 35. – P. 206-215.
2. Pantelis E., Moutsatsos A., Zourari K. et al. // *Ibid.* – 2010. – Vol. 37. – P. 2369-2379.

3. Araki F. / *Med. Phys.* – 2006. – Vol. 33. – P. 2955-2963.
4. Morin J., Büliveau-Nadeau D., Chung E. et al. // *Ibid.* – 2013. – Vol. 40. – P. 011719-1-011719-11.
5. Dieterich S., Sherouse G.M. // *Ibid.* – 2011. – Vol. 38. – P. 4166-4173.
6. Griessbach I., Lapp M., Bohsung G., Harder D. // *Ibid.* – 2005. – Vol. 32. – P. 3750-3754.
7. *Overexposure accident at Toulouse University Hospital Centre. – RSN-DRPH-2007-04 report. – 2007.*

О.Л. Ляна, Г.В. Долгіх, М.І. Хворостенко, В.І. Чорна, О.З. Бразалук

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»,

КЗ «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова»

### Порівняльна оцінка активності цистеїнових протеїназ (кальпаїнів та катепсінів) у біологічних рідинах хворих з папілярною карциномою щитоподібної залози

### Comparative assessment of cysteine proteinases activity (calpains and cathepsins) in biological fluids of the patients with papillary thyroid carcinoma

**Summary.** The authors investigated the dynamics of activity of cysteine proteinases (calcium-dependent calpains and lysosomal cathepsins) in biological fluids (blood plasma and

urine) in patients with papillary thyroid carcinoma. Increased activity of the investigated enzymes the character of which depended of the term of observation and stage of the treatment was administered, which can be considered nonspecific protective reaction to carcinogenesis, tumor invasion and/or delivered therapy.

**Key words:** cysteine proteinases, calpains, cathepsins, papillary carcinoma, thyroid gland.

**Резюме.** В работе исследована динамика активности цистеиновых протеиназ — кальцийзависимых кальпаинов и лизосомных катепсинов — в биологических жидкостях (плазме крови и моче) больных папиллярной карциномой щитовидной железы. Установлено увеличение активности исследуемых ферментов, характер которого зависел от срока наблюдения и этапа лечения больных, что рассматривается как неспецифическая защитная реакция на канцерогенез, опухолевую инвазию и/или проведенную терапию.

**Ключевые слова:** цистеиновые протеиназы, кальпаины, катепсины, папиллярная карцинома, щитовидная железа.

**Ключові слова:** цистеїнові протеїнази, кальпаїни, катепсини, папілярна карцинома, щитоподібна залоза.

Ракщитоподібної залози (РЩЗ) — найпоширеніша злоякісна пухлина ендокринних залоз. Невпинне зростання захворюваності на РЩЗ ставить цю проблему у ряд актуальних у світовій онкології. На частку папілярної карциноми припадає близько 80% усіх первинних злоякісних новоутворів щитоподібної залози (ЩЗ). Забруднення біосфери, йодний дефіцит, а також, певною мірою, впровадження у практику низки сучасних методів обстеження хворих сприяють повільному, але невпинному зростанню виявленої захворюваності ЩЗ [1, 2]. Незважаючи на певний прогрес у профілактиці, діагностиці та терапії раку ЩЗ, результати лікування хворих не завжди задовольняють клініцистів. У сучасній медичній практиці найбільшого поширення для абляції залишків тканини ЩЗ після видалення органа з приводу багаточисельного, інвазивного раку, профілактики рецидиву, а також для лікування виявлених регіонарних та віддалених метастазів, набуло використання радіоактивного ізотопу йоду  $I^{131}$ . Внаслідок здатності клітин ЩЗ і високодиференційованих пухлин та їх метастазів селективно поглинати йод, концентрація  $I^{131}$  у цих тканинах стає у кілька разів вищою, ніж у крові. Ізотоп  $I^{131}$ , що накопичився в тканинах, викликає іонізацію молекул, продукцію великої кількості вільних радикалів або короткоживучих токсичних отрут, здатних пошкодити життєво важливі біологічні структури, зокрема ДНК та ферменти. Всі ці події призводять до затримки поділу та загибелі клітин ЩЗ та/або пухлин [3]. Але деякі пухлини ерадіюють при їх локальному опроміюванні, що, як вважається, зумовлено радіорезистентністю пухлин, та пов'язане, значною мірою, з біологічною особливістю росту, а також спроможністю до репарації променевих пошкоджень [4]. Таким чином, пошук нових швидких та чутливих методів молекулярного моніторингу ефективності лікування, а також діагностики РЩЗ, основаних на детекції пухлинспецифічних білкових маркерів у біологічних рідинах ще й досі не втрачає актуальності та необхідності.

Сучасними біохімічними та клініко-біохімічними дослідженнями було показано, що серед багатьох біомаркерів онкологічних захворювань параметри внутріклітинного протеолізу привертають особливу увагу. За зміною активності тканинних протеаз у крові можна визначити ступінь катаболізму білків і роль протеолізу у розвитку та перебігу патологічного процесу, оскільки зміни активності протеолітичних ферментів мають різну спрямованість на різних стадіях патогенезу [5]. За даними літератури, а також відповідно до власних досліджень за канцерогенезу ЩЗ у біоло-

гічних рідинах хворих спостерігаються зміни активності лизосомних цистеїнових катепсинів В (КФ 3.4.22.1) та L (КФ 3.4.22.15) [6–8]. Але внутріклітинна деградація білків — результат спільної діяльності як лизосомних катепсинів, так і інших цистеїнових протеїназ, зокрема, кальпаїнів [9]. При цьому припускається, що кальпаїни (КФ 3.4.22.17) відповідають за ініціацію цього процесу [10]. Такі ферменти, які становлять родину кальційзалежних нейтральних протеїназ, є конститутивними ферментами [9]. Незважаючи на те, що фізіологічна роль кальпаїнів ще достеменно не з'ясована, вважають, що їм властиві регуляторна та сигнальна функції значно більшою мірою, ніж катаболічна, характерна для лизосомних протеїназ [7]. Кальпаїни беруть участь в основних кальційзалежних клітинних процесах — передачі сигналу, клітинному циклі, проліферації, диференціюванні, міграції, апоптозі, формуванні м'язових волокон та інших [9], а за зміною їх активності визначають деякі метаболічні порушення та дегенеративні захворювання [11].

Метою даної роботи було дослідження змін загальної активності кальпаїнів у плазмі крові та сечі хворих зі злоякісними (папілярна карцинома ЩЗ (I та II стадії — T1-2N0M0)) пухлинами ЩЗ та проведення порівняльної оцінки отриманих результатів із показниками активності інших цистеїнових протеаз — лизосомних катепсинів В та L — за обраного патологічного стану.

Об'єктом дослідження була плазма крові та сеча хворих (віком 35–70 років) зі злоякісними (папілярний рак I та II стадії, T1-2N0M0) пухлинами щитоподібної залози. Плазму крові та сечу для дослідження отримували до операції, через тиждень після операції, до радіоїодотерапії (через місяць після тиреоїдектомії) та через тиждень після неї у відділенні хірургічної ендокринології КЗ «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова», там же пухлини типували за гістоструктурою, гістогенезом та ступенем злоякісності. Контрольними були величини показників активності кальпаїнів та катепсинів, визначені в плазмі крові та сечі донорів (n = 30).

Загальну активність кальпаїнів визначали методом Moss D.E. [12] за гідролізом азоказеїну у присутності 6 мМ CaCl<sub>2</sub> та виражали в умовних одиницях екстинкції за довжини хвилі 405 нм за 1 хвилину, визначаючи активність катепсинів В та L в 1,0 мл інкубаційної суміші з 15 хв преінкубацією ферменту в присутності 2 мМ 2-меркаптоетанолу (2ME) і 1 мМ Na<sub>2</sub>EDTO [4] та виражали в умовних одиницях екстинкції при довжині хвилі 383 нм та 366 нм за 1 хвилину, відповідно. Активність катепсину В встановлювали відносно субстрату N,α-бензоїл-D,L-аргінин-р-нітроаніліду (FluKa, Switzerland). Активність катепсину L визначали за відношенням до азоказеїну (1%), денатурованого сечовиною (3,0 М). Кількісну оцінку загальної білка в пробах проводили методом Бредфорд [13]. Статистично результати опрацьовували з використанням комп'ютерної програми Excel згідно з t-критерієм Стьюдента.

Результати, отримані при дослідженні загальної активності кальпаїнів у плазмі крові хворих зі злоякісними пухлинами ЩЗ представлено на рисунку 1. Показано, що загальна активність кальпаїнів у плазмі крові хворих зі злоякісними новоутворами ЩЗ підвищується, а її рівні варіюють на різних етапах лікування. І хоча вірогідних змін величин даного показника поки що не встановлено, можна припустити, що, оскільки кальпаїни є кальційзалежними протеїназами, визначена тенденція зростання активності даних ферментів у плазмі крові може відображати зміни у концентрації кальцію в певній біологічній рідині, які, за даними А.В. Зенкова [14], спостерігаються при проведенні тиреоїдектомії та інших терапевтичних заходів при лікуванні хворих із папілярною карциномою ЩЗ.

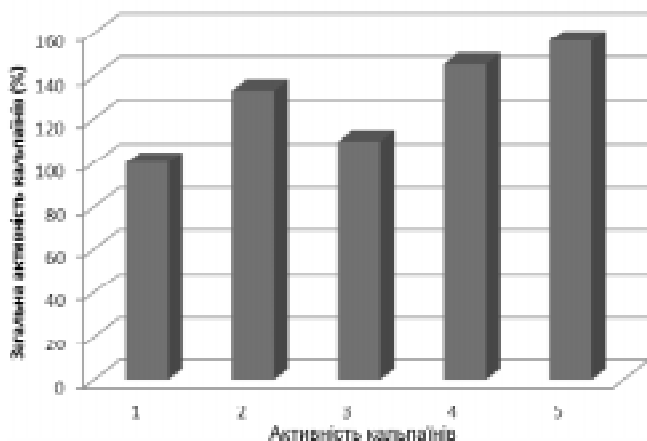


Рисунок 1. Загальна активність кальпаїнів у плазмі крові хворих із папілярною карциномою ЩЗ ( $M \pm m$ ,  $n = 12$ ): 1 — контроль; 2 — до операції; 3 — після операції; 4 — до радіойодотерапії; 5 — після радіойодотерапії

Визначення рівнів активності катепсину В ще раз підтвердило отримані нами раніше результати щодо того, що у плазмі крові хворих як із доброякісними, так і злоякісними пухлинами ЩЗ вірогідних змін активності даного ферменту порівняно з контрольними показниками не відбувається [7, 8]. Результати визначення рівня активності лізосомного цистеїнового катепсину L представлено на рисунку 2. Показано, що у плазмі крові хворих на папілярну карциному ЩЗ відбувається підвищення рівня динаміки активності даного ферменту на всіх етапах спостереження (див. рисунок 2). Цікаво відзначити, що при папілярній карциномі ЩЗ рівні активності цистеїнових протеїназ — кальпаїнів та катепсину L — у плазмі крові до операції та через місяць після неї, у термін перед проведенням радіойодотерапії мають дещо подібну тенденцію до зростання.

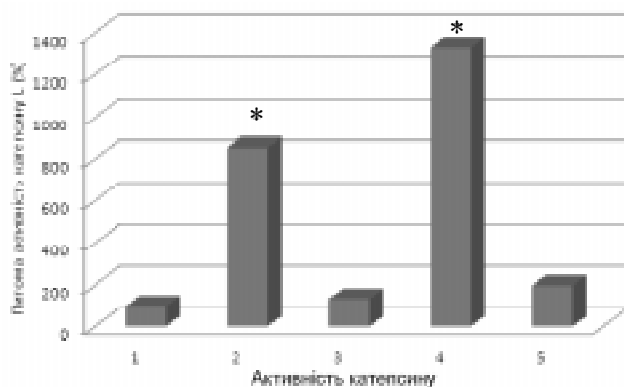


Рисунок 2. Активність катепсину L у плазмі крові хворих із папілярною карциномою ЩЗ ( $M \pm m$ ,  $n = 29$ ): 1 — контроль; 2 — до операції; 3 — після операції; 4 — до радіойодотерапії; 5 — після радіойодотерапії. \*  $p < 0,05$  відносно контрольного показника

Відомо, що формування новоутворів ЩЗ — це багатоступінчастий комплексний процес. Загальним для формування пухлин будь-якого органа є порушення механізмів нормальної клітинної проліферації, що пов'язано зі змінами у регуляторних процесах звичайного клітинного циклу [15]. Зазначається, що на ростову активність тиреоїдних клітин впливають такі фактори, як тиреотропний гормон та взаємодія його з рецептором; фактори росту, інтерлейкіни; йод; онкогени та онкопротеїни; гени-супресори пухлинного росту та інші фактори, які беруть участь у тиреоїдному канцерогенезі [16]. Не виключаючи особливої значу-

щості йодного дефіциту у розвитку онкологічної патології ЩЗ, а також умовно (оскільки дані механізми й досі залишаються предметом дискусії), пов'язаних з цим послідовних етапів індукції тиреоїдного росту, підвищення активності кальційзалежних та лізосомних протеїназ у плазмі крові хворих можна пояснити, спираючись на такі факти. Відповідно до концепції Vigneri et al. [17], в умовах хронічного дефіциту споживання йоду відбувається підвищення рівня тиреотропного гормону (ТТГ). Дана тенденція підтверджується і нашими власними результатами [8], та пояснюється, на думку Vigneri et al. [17], порушенням синтезу та секреції тиреоїдних гормонів. Слід зазначити, що катепсин L — одна з найактивніших цистеїнових протеїназ, залучена до всіх етапів процесу тиреоїдних гормонів, крім того, на момент установлення діагнозу активність даного ферменту значно перевищує величину контрольного показника. Збільшена чутливість тиреоїдних гормонів до ТТГ на фоні дефіциту йоду детермінована зростанням двох основних внутріклітинних посередників ТТГ — цАМФ та кальцію. Таке підвищення концентрації кальцію може сприяти зростанню активності залежних від кальцію ферментів, зокрема кальпаїнів. Крім того, продемонстроване зростання рівня активності катепсину L відповідає визначеним змінам концентрації тиреоїдних гормонів [8] та свідчить на користь залучення цистеїнових протеїназ до патогенезу ЩЗ, оскільки, як зазначає Vigneri et al., відповідно до наведених умов, тиреоїдні клітини мають підвищену, порівняно з нормою, чутливість до стимулюючої дії ТТГ, яка призводить до проліферації даних клітин, сприяючи їх злоякісній трансформації.

Результати визначення загальної активності кальпаїнів у сечі хворих з папілярною карциномою представлено на рисунку 3.

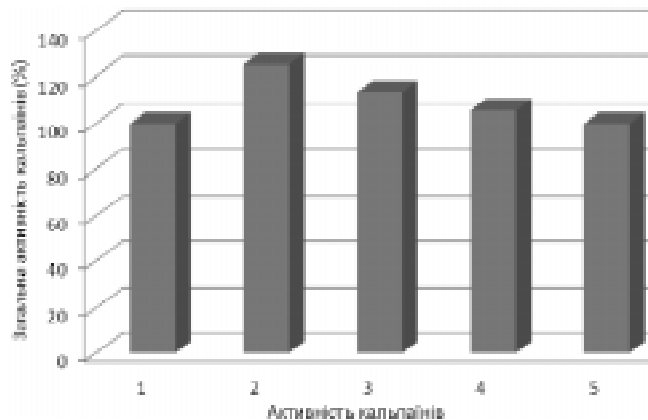


Рисунок 3. Загальна активність кальпаїнів у сечі хворих із папілярною карциномою ЩЗ ( $M \pm m$ ,  $n = 8$ ): 1 — контроль; 2 — до операції; 3 — після операції; 4 — до радіойодотерапії; 5 — після радіойодотерапії

Найвищий рівень загальної активності кальпаїнів у сечі хворих спостерігається у доопераційний період, а у процесі лікування проявляється тенденція до нормалізації рівня даного показника.

При аналізі рівнів активності цистеїнових катепсинів В та L у сечі хворих також визначено зростання величин даних показників з характерним максимумом на момент постановки діагнозу (рисунок 4). Визначені особливості розподілу активності цистеїнових протеїназ свідчать про посилення протеолізу, ймовірно, викликане адаптивними змінами у клітинах організму в цілому за канцерогенезу ЩЗ.

Відомо, що кислі протеїнази, зокрема цистеїнові катепсини, які секретують пухлинні тканини в інтерстиціальну рідину, здатні руйнувати первинні мембранні капіляри,

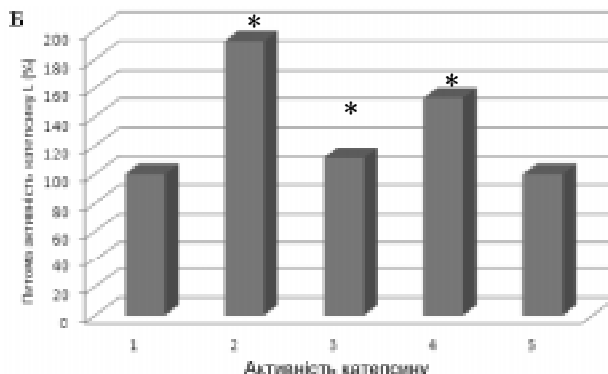
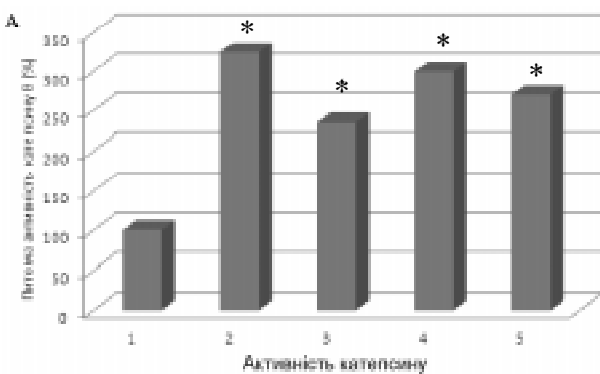


Рисунок 4. Пітома активність катепсину В (А) та L (Б) у сечі хворих із папілярною карциномою ЩЗ (М ± m, n = 25): 1 — контроль; 2 — до операції; 3 — після операції; 4 — до радіодотерапії; 5 — після радіодотерапії. \* p < 0,05 відносно контрольного показника

сприяючи проникненню ракових клітин крізь стінки судин до тканин хазіяна та формуванню метастазів. Видалення пухлини — джерела надмірної протеолітичної активності — спричиняє відповідну реакцію з боку системи протеолізу всього організму, що проявляється у зменшенні як активності кальпаїнів, так і лізосомних катепсину у 1,1, 1,4 та 1,7 разу відповідно порівняно з попереднім терміном спостереження (див. рисунки 3 та 4). Подальші зміни, які відбуваються у післяопераційний період, демонструють адаптивну відповідь системи протеолізу на метаболічні перебудови в цілому організмі у процесі лікування хворих.

Отримані величини показників активності ферментів після радіодотерапії можуть бути спричинені порушеннями функціонування тиреоцитів, викликаними накопиченням радіоактивного йоду в клітинах ЩЗ. При застосування  $I^{131}$  променева доза на все тіло складається із гамма-випромінення, яке випускається від накопичення радіонукліду у ЩЗ і крові [18]. Результатами сучасних радіобіологічних досліджень визначено, що за дій низьких рівнів іонізуючого випромінення важливу роль у виникненні радіаційних реакцій відіграють пошкодження мембранних структур, які забезпечують життєдіяльність клітини. Порушення внутріклітинної компартменталізації протеолітичних ферментів (особливо з лізосомною локалізацією) є одним із важливих ланцюгів розвитку променевої патології, оскільки порушення проникності лізосомних мембран під впливом випромінення створює сприятливі умови для виходу катепсину з лізосом, дезорганізуючи метаболічні процеси в клітині і посилюючи первинні радіаційні зрушення.

Таким чином, на різних стадіях пухлинного процесу як у плазмі крові, так і у сечі хворих з папілярною карциномою щитоподібної залози відмічаються зміни активності цистеїнових протеїназ як лізосомного, так і цитозольного походження, при цьому більшу чутливість до надзвичайних подразників проявляє саме лізосомний апарат клітин. Встановлене підвищення активності досліджуваних протеолітичних ферментів розглядається як неспецифічна захисна реакція на канцерогенез, пухлинну інвазію та/або проведені терапевтичні заходи. Подальше з'ясування особливостей стимуляції протеолізу за канцерогенезу ЩЗ має сприяти не тільки розумінню механізмів онкологічних захворювань даного органа, але й визначати шляхи діагностики та отримання ефективних параметрів для моніторингу обраних терапевтичних дій.

## Література

1. Митник З.М., Жданова М.П., Крушинська З.Г. та ін. // *Международ. эндокринолог. журн.* — 2008. — № 3 (15). — С. 8–15.

2. Штандель С.А., Барилляк И. Р., Хазиев В. В., Гонкалова И.В. // *Эколог. генет.* — 2010. — Т. VIII, № 1. — С. 42–49.

3. Гарбузов П.И., Дроздовский Б.Я., Родичев А.А., Тимохина О.В., Подольхова Н.В. // *Практ. онкол.* — Т. 8, № 1. — 2007. — С. 42–45.

4. Чорна В.І. Цистеїнові катепсини в умовах променевого ураження та злоякісного росту: Дис. ... д-ра біол. наук. — К.: 2001. — 298 с.

5. Berdowska I. // *Clin. Chim. Acta.* — 2004. — Vol. 342. — P. 41–69.

6. Friedrichs B., Tepel C., Reinheckel T. et al. // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 111, № 11. — P. 1733–1745.

7. Чорна В.І., Лянна О.Л. Лізосомні цистеїнові протеази: молекулярна структура і функції. — Харків: Екограф, 2013. — 296 с.

8. Лянна О.Л., Чорна В.І., Хворостенко М.І., Дорофєєва Н.А. // *Наук. праці.* — 2010. — Т. 139. — С. 53–58.

9. Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. // *Physiol. Rev.* — 2003. — Vol. 83. — P. 731–801.

10. Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H. // *Diabetes.* — 2004. — Vol. 53, Suppl.1. — P. S12–S18.

11. Huang Y., Wang K.K.W. // *Trend. Mol. Med.* — 2001. — Vol. 7. — P. 355–362.

12. Moss D.E., Gutierrez Y.R., Perez R.G., Kobayashi H. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 1991. — Vol. 39. — P. 495–497.

13. Bradford M. // *Anal. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.

14. Зенкова А.В. // *Вестник ОГУ.* — 2010. — Т. 112, № 6. — С. 74–77.

15. Дедов И.И., Трошина Е.А., Мазурина Н.В. и др. // *Пробл. эндокринолог.* — 2000. — Т. 46. — С. 22–30.

16. Cohen S.M., Ellwein L.B. // *Science.* — 1990. — Vol. 31. — P. 1007–1011.

17. Vigneri R., Catalfamo R., Freni V. et al. // *Minerva Endocrinol.* — 1993. — Vol. 8, № 4. — P. 143–145.

18. Гарбузов П.И., Дроздовский Б.Я., Родичев А.А. и др. // *Практ. онкол.* — Т. 8, № 1. — 2007. — С. 42–45.